Aus der Inneren Abteilung des Städt. Behring-Krankenhauses

Chefarzt: Professor Dr. med. F. A. PEZOLD

ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON GALLENSÄUREN UND ANDEREN OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN AUF DAS LIPOPROTEID- UND PROTEINSPEKTRUM DES SERUMS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Fröhlich

aus Buschdorf Kreis Flatow/Ostpommern

1962

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Inneren Abteilung des Städt. Behring-Krankenhauses

Chefarzt: Professor Dr. med. F. A. PEZOLD

ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON GALLENSÄUREN UND ANDEREN OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZEN AUF DAS LIPOPROTEID- UND PROTEINSPEKTRUM DES SERUMS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian Fröhlich

aus Buschdorf Kreis Flatow/Ostpommern

Dekan: Professor Dr. med., Dr. med. dent. Ewald HARNDT
Referent: Professor Dr. med. Fritz A. Pezold
Korreferent: Professor Dr. med. Gotthard Schettler

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. Juli 1962

Übersicht
========

I. Einleitung

Die Gallensäuren
Physiologisches und pathologisches Vorkommen
Wechselwirkung zum Cholesterin- und Gesamtlipidspiegel
Netzmittel anderer Art
Einfluß auf die Lipide und Proteine des Serums

Bisherige Anschauungen über den Wirkungsmechanismus der oberflächenaktiven Substanzen

Zielsetzung der eigenen Untersuchungen

II. Methodik

Besprechung der angewandten Substanzen

a) Gallensäuren
b) Na-oleat, Tween 80, Zephirol,

Auswahl der Seren

Elektrophoretisches Verfahren

a) normale Elektrophorese
b) vorgenommene Abwandlungen des normalen elektrophoretischen Verfahrens

III. Untersuchungen im einzelnen

a) Versuche mit Na-desoxycholicum

Versuche mit Na-dehydrocholicum

Versuche mit Na-cholalicum und Glykocholsäure

Übersicht über die Ergebnisse der Untersuchungen mit Gallensäuren

b) Versuche mit Na-oleinicum

Versuche mit Tween 80

Versuche mit Zephirol

IV. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

a) Lipoproteidfraktionen
b) Proteinfraktionen
c) Wechselseitige Beeinflussung der Lipoproteid- und Proteinfraktionen

V. Diskussion über den Wirkungsmechanismus der untersuchten Substanzen

a) Oberflächenaktivität
b) Polarer Charakter der Substanzen
c) Spezielle Wirkung einzelner Substanzen

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturangaben

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

I. Einleitung

Die methodische Fortentwicklung der kolloidchemischen Forschung, insbesondere die Anwendung schonender Aufbereitungsverfahren des Serums wie Elektrophorese- und Ultrazentrifugenmethoden, haben der Erforschung der Plasmabestandteile starken Auftrieb gegeben.

Untersucht man die funktionelle Potenz der biologischen Substanzen des Tier- und Pflanzenreiches, so stößt man überall in den zellulären und plasmatischen Anteilen auf ein Nebeneinander verschiedener Phasen, die durch Grenzflächen voneinander getrennt sind. Diese sind, in ihrer Gesamtheit betrachtet, von erheblicher Ausdehnung und insbesondere dort von großem Interesse, wo feste Strukturen des Gewebes von wässrigen Lösungen umspült werden. An allen Grenzflächen laufen von der Kolloidchemie her bekannte Reaktionen ab und herrschen deren Gesetzmäßigkeiten. Von besonderem Interesse sind die Probleme der Grenzflächenerscheinungen und die eng mit ihnen zusammenhängenden Adsorptionsvorgänge. Letztere sind direkt abhängig von der jeweiligen Spannung zwischen zwei Phasen, der sogenannten Grenzflächenspannung. Sie ist der Sitz potentieller Energie. Stoffe, die sich an dieser Oberfläche anreichern, heißen oberflächenaktiv. Diese Aktivität kann durch Messen der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit vor und nach Zusatz solcher Substanzen gemessen werden (im Stalagmometer und anderen Verfahren).

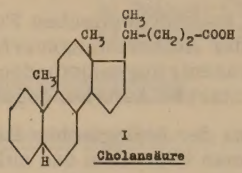
Unter anderen gehören zu den oberflächenaktiven Substanzen die gallensauren Salze. Im folgenden soll nicht die Rede sein von der Rolle der Gallensäuren für die Resorption der Fette im Darm, obwohl auch hierbei an den Grenzflächen für die Fettaufnahme wichtige Vorgänge ablaufen, die den Angriff der Verdauungsfermente unterstützen, sondern es soll ausschließlich die Rolle der Gallensäuren während ihrer Anwesenheit im Blut beleuchtet werden.

Die Gallensäuren

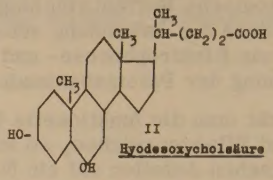
Die Entstehung der Gallensäuren im Organismus aus dem Cholesterin konnte jetzt durch Isotopenversuche nachgewiesen werden (55.5). Als Grundkörper aller Gallensäuren kann die Cholansäure (s. Formel I) aufgefaßt werden. Durch Einführung von Hydroxylgruppen leiten sich von ihr die einzelnen Gallensäuren ab.

Im Blutserum sind sie bisher von verschiedenen Autoren nachgewiesen worden. Eine Fülle von Methoden wurde dazu angegeben: Stalagmometrische und gasometrische Verfahren, jodometrische Titrationen und gravimetrische Nachweise; schließlich die Bestimmung durch Umwandlung der Gallensäuren in gefärbte oder UV-adsorbierende Substanzen. Von der Mehrheit der Untersucher wurde der Gallensäurespiegel als solcher ohne Unterscheidung von Cholsäure, Desoxycholsäure u. a. bestimmt. Bei Bestimmungen der jüngsten Zeit (25, 9, 39) wurden gesonderte Messungen der Dioxy- und Trioxycholansäuren durchgeführt. Zur Gruppe der Dioxycholansäuren gehört die Hyodesoxycholsäure

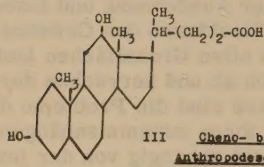
(Formel II) und Cheno- bzw. Anthropodesoxycholsäure (Formel III); der Trioxycholansäure entspricht die Cholsäure (Formel IV).



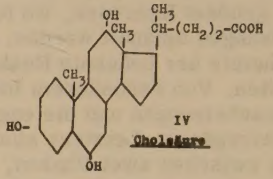
I
Cholansäure



II
Hyodesoxycholsäure



III Cheno- bzw. Anthropodesoxycholsäure



IV
Cholsäure

Im folgenden eine kurze Zusammenstellung der von verschiedenen Autoren angegebenen Serum-Normalwerte:

THANNHAUSER (57)	0,3	-	1,5	mg %
JOSEPHSON (22)	0,6	-	1,8	mg %
IRVIN, JOHNSTON und KOPALA (18)	0,4	±	0,2	mg %
KIER (25)				
Cholsäure	0			mg %
Desoxycholsäure	35	-	42	mg %
COREY (9)				
Cholsäure	1,1	±	0,4	mg %
Desoxycholsäure	0,47	±	0,2	mg %
SOBEL, GOLDBER und SLATER (56)	2,7			mg %
KORANSKY und THIELE (26)	3,0	±	0,2	mg %
RUDMAN und KENDALL (39)				
Cholsäure	0			mg %
Desoxycholsäure	0			mg %

Der Unterschied in den Angaben der einzelnen Autoren über die Höhe der Gallensäurekonzentration im Normalserum beruht häufig darauf, daß von ihnen - wie oben schon erwähnt - die Gallensäuren nicht einzeln, sondern in ihrer Gesamtheit erfaßt wurden. Zur Messung der Gallensäurekonzentration im Serum wurde in den meisten Fällen die UV-Absorption herangezogen. Kontrollversuche ergaben aber, daß gerade die UV-Absorption der verschiedenen Gallensäuren recht unterschiedlich ist. Als weiterer Grund für die unterschiedlichen Angaben über die Höhe der Gallensäurekonzentration im Serum kommt die Verschiedenheit der Reinigungsverfahren hinzu, denen die Seren vor Bestimmung des Gallensäurespiegels unterworfen wurden.

Die Diskussion über den Gallensäuregehalt des Serum ist in jüngster Zeit in ein neues Stadium eingetreten, nachdem RUDMAN und KENDALL (39) bei ihren Untersuchungen mit papierchromatographischen Methoden unter physiologischen Verhältnissen überhaupt keine Gallensäuren im Serum nachweisen konnten (s. a. obere Zusammenstellung).

Die Gallensäuren kommen im Serum wahrscheinlich nicht frei, sondern an Proteine adsorbiert vor, wie die Untersuchungen COHNs (8) vermuten lassen. Dieser Autor konnte nachweisen, daß die Gallensäuren ihre hämolytische Wirkung auf die Erythrocyten bei Anwesenheit von Albuminen verloren. Eine Feststellung ähnlicher Art machte Lecomte de NOUY (28), der beobachtete, daß die Wirkung gallensaurer Salze, die Oberflächenspannung einer wässrigen Lösung herabzusetzen, weitgehend durch das Hinzutreten von Serum gehemmt wurde. RUDMAN und KENDALL (40) stellten schließlich fest, daß die im Serum Leberkranker gefundenen Gallensäuren nicht dialysierbar waren.

Diese Autoren untersuchten in neuester Zeit auch das Bindungsvermögen der einzelnen Proteinfraktionen gegenüber den Gallensäuren. Ihre anhand eines Dialysierverfahrens gewonnenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle kurz zusammengefaßt:

Plasmaproteinfraktionen n. COHN	Desoxycholsäure	Cholsäure	Glykodesoxycholsäure	Glykocholsäure
I) Fibrinogen	0	0		
II) γ-Globulin	0	0		
III) ß-Globulin	1,5	0	1,6	
IV-1) α-Globulin	1,8	0	1,3	
V) Albumin	3,3	1,4	3,3	1,3

Tab. 1: Bindungsvermögen der Proteinfraktionen gegenüber verschiedenen Gallensäuren (nach RUDMAN und KENDALL (40)). Die Angaben sind in mM x 10^{-3} Gallensäuren gebunden an 100 mg Eiweiß gemacht.

RUDMAN und KENDALL konnten auch eine Abhängigkeit der Bindungsverhältnisse der Albuminfraktion vom ph-Wert der umgebenden Lösung feststellen. Sie nehmen an, daß es sich bei der vorliegenden Bindungsart hauptsächlich um eine elektrostatische Bindung zwischen dem Albumin einerseits und den Gallensäuren andererseits handele, wahrscheinlich einer Bindung zwischen der positiv geladenen Lysinkomponente der einen und der negativ geladenen Carboxylgruppe der anderen Seite.

Die physiologische Wirkung der Gallensäuren im Blutserum ist unbekannt. Nach Auffassung von FRIEDMAN und BYERS (15) sind sie auf Grund ihrer Oberflächenaktivität für die Komplexbildung aus Proteinen und anderen Substanzen im Serum von Bedeutung. Insbesondere wird dabei an die Bildung der Lipoproteide aus Proteinen und Lipiden gedacht.

Genauer bekannt sind Erscheinungen, die bei pathologisch erhöhtem Gallensäurespiegel zu beobachten sind. RUDMAN und KENDALL (39) fanden in zwei Fällen von Verschlußikterus einen Anstieg des Anteils der höher oxydierten Gallensäure Cholsäure am Gesamtgallensäuregehalt gegenüber den Befunden bei Leberzirrhotikern. Gleichzeitig beobachteten sie auch in den Fällen mit Verschlußikterus einen stark erhöhten Anteil der an Glycin und Taurin gekoppelten Gallensäuren. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Mitteilung von BERGSTRÖM und GLOOR (4), die in der Rattenleber ein Enzym nachweisen konnten, das die Oxydation der Dioxy- zur Trioxycholsäure bewirkt und eines zweiten, das die Konjugation der freien Gallensäuren mit Glycin und Taurin durchführt. Da bei der Leberzirrhose das Lebergewebe in mehr oder weniger großem Umfang zerstört und das Gesamtorgan in seiner Leistung erheblich herabgesetzt ist, erklärt sich zwangsläufig das erhebliche Überwiegen der weniger oxydierten Form der Desoxycholansäure und ihr Auftreten in zu 80 % weder an Glycin noch Taurin gebundener Form.

Dagegen müssen in den Fällen mit Gallengangsverschluß, solange die Leberzelltätigkeit nicht stärker geschädigt d. h. sowohl die Produktion der Gallensäuren wie auch die Aktivität beider Enzyme noch intakt ist, die Gallensäuren länger der Einwirkung beider Enzyme ausgesetzt sein. Es erklärte sich so das Überwiegen der höher oxydierten Cholsäure gegenüber der Desoxycholsäure und der an Glycin und Taurin gekoppelten Gallensäuren gegenüber den freien Gallensäuren.

Ein anderes typisches Symptom des Verschlußikterus ist neben dem Anstieg des Gallensäurespiegels im Blut die Hypercholesterinaemie. Daß dieses Zusammentreffen von Hypercholataemie und Hypercholesterinaemie nicht zufällig ist, bewiesen die Untersuchungen von FRIEDMAN und BYERS (15). Sie stellten außer im Falle des Verschlußikterus auch bei Hypercholesterinaemien anderer Genese einen erhöhten Gallensäurespiegel im Blute fest (38). Im Tierexperiment konnten sie nachweisen, daß auch durch intravenöse Injektionen von Cholsäure eine Hypercholesterinaemie sich hervorrufen ließ (12). Außerdem beobachteten sie bei Tieren mit alimentär bedingter Hypercholesterinaemie ebenfalls eine Erhöhung der Cholatkonzentration im Serum (37). Als sehr wahrscheinliche Ursache der sich offenbar gegenseitig bedingenden Hypercholesterinaemie und Hypercholataemie konnten sie schließlich nachweisen, daß Ratten, denen Gallensäuren injiciert wurden, ihr Plasma von den auftretenden pathologisch hohen Cholesterinwerten nicht so schnell reinigen konnten wie Versuchstiere, denen nur hypercholesterinaemisches Serum eingespritzt wurde (7). Alle anderen Ursachen, die für die Hypercholesterinaemie noch in Frage hätten kommen können, wurden von ihnen ausgeschlossen. (Erhöhte intestinale Absorption, Abnahme der infestinalen Excretion, Abnahme des Gewebecholesterins, Umwandlung der Gallensäuren in Cholesterin).

Auch von RUDMAN und KENDALL wurde beobachtet, daß einer Hypercholesterinaemie eine Erhöhung der Gallensäurekonzentration im Blut parallel läuft (39). Auch sie stellten hierbei insbesondere einen Anstieg der Cholsäure fest.

Auf Grund ihrer Versuchsergebnisse wurde von FRIEDMAN und KENDALL die Meinung vertreten, daß für die Behinderung der Cholesterinausscheidung ein Defekt an der Leberzelle bzw. eine Behinderung des Übergangs des Plasmacholesterins in die Leberzelle in Frage käme. Sie sind der Ansicht, daß für diese Behinderung wahrscheinlich eine unter dem Einfluß der oberflächenaktiven Gallensäuren aufgetretene Änderung der Cholesterinbindungsfähigkeit der betreffenden Plasmaproteine verantwortlich zu machen sei (40).

Andere Untersucher, wie SCHULZE und STIERNSPITZ (54) weiteten ihre Untersuchungen über die Wirkung erhöhter Gallensäurekonzentrationen im Serum über die Beobachtung der Cholesterinfraktion weiter auf den Gesamtlipidgehalt des Serums aus. Sie kamen zu der Feststellung, daß einem erhöhten Cholatgehalt des Serums immer auch ein erhöhter Gesamtlipidgehalt entsprach, ohne daß dabei eine betonte Erhöhung des Cholesterinspiegels ersichtlich war oder eine bevorzugte Korrelation zu einem der anderen Serumlipidbestandteile beobachtet wurde. Ob jeweils eine Störung des Lipidstoffwechsels oder des Cholatstoffwechsels primär vorlag, konnten sie nicht entscheiden.

Das in seiner Höhe gleichlaufende Verhalten des Cholat- und Gesamtlipidspiegels ist insbesondere im Hinblick auf die oben erwähnte Ansicht bemerkenswert, die Gallensäuren bewirkten eine größere Bindungsfestigkeit zwischen Lipid- und Eiweißbestandteilen des Serums.

Wie zu erwarten, konnte bald auch der Einfluß anderer oberflächenaktiver Substanzen auf den Cholesterin- und Gesamtlipidspiegel des Serums nachgewiesen werden. BERG und SCHÖN untersuchten in jüngster Zeit die Wirkung, die intraperitoneal zugeführtes Triton (WR 1339 = polymeres p-Isooktylpolyoxyaethylen) bei Ratten auf die Glykoproteid-, Lipoproteid- und Proteinbestandteile des Serums hervorrief (3). Sie beobachteten dabei eine Hyperlipaemie auf Grund einer Zunahme des Serumcholesterins und der Serum-Phosphatide. Gleichzeitig konnten sie jedoch auch Proteinveränderungen im Serum feststellen. Dabei nahm die Albuminfraktion an Stärke ab bei gleichzeitiger Zunahme der ß- und γ-Globuline. Die Dysproteinaemie konnten sie teilweise durch eine Zunahme der Lipoproteide im ß-Bereich und der Glykoproteide im ß- und γ-Bereich erklären. Diese Änderungen im Spektrum der einzelnen Serumbestandteile sind nach ihrer Meinung zurückzuführen auf Permeabilitätsstörungen infolge Veränderung der Zellgrenzflächenverhältnisse durch das Netzmittel, wodurch das Einschwemmen zellständiger Lipo- und Glykoproteide ermöglicht würde. Ihre Ansicht gewinnt noch dadurch an Gewicht, daß sie eine gleichzeitige Zunahme der Fermentaktivität im Serum beobachten konnten.

Ob Netzmittel auf Grund ihrer Oberflächenaktivität wirklich an Zellgrenzen eine derart starke Wirkung entfalten können, um das Einschwemmen zellständiger Bestandteile in das Blut hervorzurufen, ist fraglich. Die Zellgrenzflächenspannungen gegenüber der Umgebung sind so gering - es werden Werte der Größenordnung 0,1 - 0,01 dyn/cm angegeben - und die Zellgrenzen weisen infolgedessen eine so starke Hydratation auf, daß der Einfluß oberflächenaktiver Substanzen hier kaum von wesentlicher Bedeutung sein kann (71). Andererseits sind als Angriffspunkt der dem Serum zugefügten oberflächenaktiven

Mittel die Grenzflächen der Serumkolloide selbst insbesondere der Lipoproteide mit ihrer höheren Grenzflächenspannung nicht auszuschließen, entsprechend der oben angeführten Meinung von FRIEDMAN und BYERS, daß durch Gallensäuren eine größere Bindungsfestigkeit zwischen Cholesterin und Trägereiweiß zustande käme, die für die Behinderung des Übergangs von Plasmacholesterin in die Leberzelle verantwortlich sei und dadurch die Hypercholesterinaemie durch die Hypercholataemie hervorriefe.

Auch andere Untersucher (50) sind der Ansicht, daß weitgehende Veränderungen an den Lipoproteiden selbst eintreten, jedoch in der Weise, daß dieser Lipid-Proteinkomplex von dem Netzmittel - in ihrem Falle Triton - so überzogen wird, daß er der im Serum vorhandenen Lipoproteid-Lipase als Substrat entzogen werden. Der so veränderte Lipid-Proteinkomplex nehme dann auch nicht mehr an der Klärung durch den Clearing-Faktor teil.

Die vorliegenden Untersuchungen sind darauf gerichtet, die Wirkung der Gallensäuren und anderen Netzmittel auf die Lipoproteide und Proteine des menschlichen Serums zu studieren. Wir hielten das Verfahren der Protein- und Lipoproteidelektrophorese deshalb für besonders geeignet, weil bei ihrer Anwendung in einem Arbeitsgang unter gleichen Bedingungen die Wirkung oberflächenaktiver Substanzen sowohl auf den Lipid- als auch auf den Proteinanteil des Lipoproteidkomplexes beobachtet werden kann und gerade die Methode der Papierelektrophorese die unmittelbare Beobachtung von Grnezflächenerscheinungen erleichtert. Es wurden nur "in vitro" Versuche durchgeführt, um jede Beteiligung des Organismus, insbesondere der Zellgrenzflächen der Leber, an der Wirkung der Netzmittel auszuschließen.

II. Methodik

I) Angewandte Substanzen

1) Gallensäuren

a) Na-desoxycholicum M. G. 414,50

Na-desoxycholat

Strukturformel der Desoxycholsäure s. S. 6

Handelsform: Na-desoxycholat Fa. E. Merck Darmstadt

b) Na-dehydrocholicum M. G. 424,50

Na-dehydrocholat ($C_{24}H_{33}NaO_5$)

Bezogen als Reinsubstanz "Natriumsalz der Dehydrocholsäure" von der wissenschaftlichen Abteilung der Fa. Riedel de Haen A.G. Berlin.

c) Na-cholalicum M. G. 430,55

Na-cholat, Na-cholicum, Natriumsalz der Cholsäure.

($C_{24}H_{39}O_5Na$)

Handelsform: Na-cholalicum (cholicum) puriss.

E. Merck A.G. - Darmstadt

d) Glykocholsäure

Acid. glycocholicum

Als Reinsubstanz "Glykocholsäure" von der wissenschaftlichen Abteilung der Fa. Riedel de Haen A.G. Berlin bezogen.

Natrium oleat

Natrium oleinicum, ölsaures Natrium, $C_{17}H_{33}COONa$

M. G. 304,26

Natriumoleat gehört zu den jonogenen und wie alle Seifen zu den anionaktiven Emulgatoren.

Das Anion des Moleküls ist sehr groß und besitzt die oberflächenaktive Eigenschaft, während das Kation sehr klein ist.

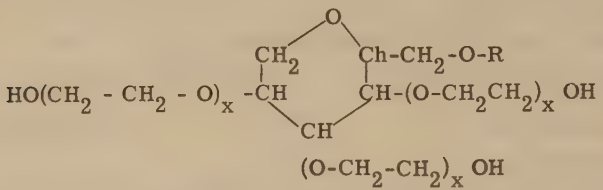
$C_{17}H_{33}COO^- + Na^+$

Natriumleat stellt eine viscöse ölige Flüssigkeit dar, die in Wasser löslich ist.

Handelsform: Natrium oleinicum puriss. Fa.: E. Merck Darmstadt

Tween 80

Chem. Bezeichnung: Polyaethylenglykoll-Sorbitan-Monoleat



Tween 80 : R = Ölsäurerest

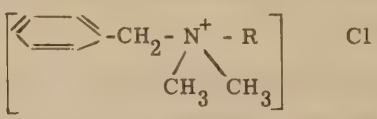
x = ca. 6 x

Tween 80 ist ein Sorbitanhydrid mit Polyaethylenglykollen veraethert und mit einem Mol Ölsäure verestert.
Es gehört zu den nicht-jonogenen Emulgatoren und ist in Wasser u. a. leicht löslich.

Handelsform: Tween 80 Atlas-Goldschmidt GmbH Essen

Zephirol M. G. 354,00

Zephirol ist ein Gemisch von
Alkyldimethylbenzyl ammonium-chloriden der Formel



R = Mischung der Alkyle C_8H_{17} bis $C_{18}H_{37}$

Zephirol ist eine quaternäre N-Verbindung und gehört zu den kationischen Stoffen oder "Invertseifen". Bei diesen Stoffen liegt der oberflächenaktive Teil im Kation. In ihren Eigenschaften stehen sie den Seifen nahe, mit dem Unterschied, daß der lipophile Teil hier positiv geladen ist und der hydrophile Teil negativ.

Handelsform: Zephirol Fa. Bayer Leverkusen

Auswahl der Seren

Für die vorliegenden Versuche wurde in erster Linie Serum von gesunden Personen verwandt. Darüber hinaus benutzten wir jedoch auch Serum von Patienten, die keine Anzeichen einer Stoffwechselstörung boten oder Verschiebungen im Eiweiß- bzw. Lipoproteidelektropherogramm aufwiesen, wie z. B. Patienten mit leichten Formen vegetativer

Dystonie, Zustand nach akuter Gastritis u. ä.

Von diesen Seren wählten wir diejenigen aus, die eine gute Ausprägung ihrer Lipoproteidfraktionen erkennen ließen, wobei ihre Stärke jedoch immer im physiologischen Rahmen blieb.

Eine Unabhängigkeit der Wirkung der verwandten Substanzen von dem jeweils benutzten Serum ergibt sich daraus, daß bei den Versuchen, bei denen eine Substanz mehreren Seren unter denselben Bedingungen zugeführt wurde, bei der Elektrophorese dieser Seren die benutzte Substanz in jedem Fall nach Art und Umfang die gleiche Wirkung zeigte.

Mischen der Seren mit den oberflächenaktiven Substanzen

Die angeführten oberflächenaktiven Stoffe fügten wir den Seren in der Weise zu, daß wir zuerst eine Verdünnungsreihe dieser Substanzen aufstellten. Danach wurde je 0,1 ml jeder Stufe dieser Verdünnungsreihe mit 1,9 ml Serum gemischt, so daß das Verhältnis von 1 : 19 zwischen der Menge der die oberflächenaktive Substanz enthaltenden Lösung und dem Serum immer bestehen blieb. Dieses Verfahren behielten wir für alle Versuche bei.

Das derart gemischte Serum wurde danach für 48 Stunden im Eisschrank bei einer Temperatur von +4° C aufbewahrt und dann der Elektrophorese unterzogen. Da es sich bei entsprechenden Versuchen herausstellte, daß die elektrophoretischen Ergebnisse auch nach 8 - 14 Tagen die gleichen waren, wurde auf einen festgelegten zeitlichen Abstand zwischen Mischung des Serums und seiner Elektrophorese nur insofern Wert gelegt, als die Elektrophorese eines solchen Serums mit ihren Wiederholungen und den Abwandlungen des elektrophoretischen Verfahrens in dem Zeitraum zwischen dem 2. und 8. Tag nach Mischung des Serums mit der oberflächenaktiven Substanz vorgenommen wurde. In der Zwischenzeit bewahrten wir das Serum in geschlossenen Reagenzröhrchen im Eisschrank auf.

Technik der Elektrophorese

Eine Beschreibung des normalen papierelektrophoretischen Verfahrens zur Darstellung der Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen, wie wir es zur einfachen Elektrophorese benutzten, wurde beschrieben im:

"Taschenbuch der Medizinisch-Klinischen Diagnostik"
(Müller-Seifert-v. Kress) s. a. (69)
v. Bergmann München 1959

Angaben über die Fehlerbreite des standardisierten Verfahrens, insbesondere bei der Bestimmung der relativen Stärke der Eiweißfraktionen, wurden ebenfalls dort aufgeführt.

Die Methode zur Anfärbung der Lipoproteidfraktionen auf dem Elektrophoresestreifen übernahmen wir von DURRUM (11).

Weitere Einzelfragen zur Methodik wurden in der Literatur von PEZOLD (31, 32, 33, 34, 36), WUNDERLY (62, 63, 74) u. a. besprochen.

Abwandlungen des normalen Elektrophoreseverfahrens

Bei Benutzung der gebräuchlichen Elektrophoreseverfahren für Eiweiße und Lipoproteide wurden Abweichungen im elektrophoretischen Verhalten der Fraktionen unter der Wirkung der angeführten Substanzen beobachtet.

Zur Auswertung und genauen Beurteilung traten diese Änderungen im Elektropherogrammbild jedoch häufig nicht genügen scharf umschrieben auf und - soweit es neu auftretende Fraktionen betraf - waren diese zur quantitativen Erfassung meist zu schlecht von den übrigen bedeutend stärkeren Fraktionen abgesetzt.

Diese Nachteile des beschriebenen Elektrophoreseverfahrens machten sich besonders bei der Beurteilung der den Änderungen im Lipoproteidspektrum parallel auftretenden Änderungen im Proteinelektropherogramm sehr bemerkbar. Es mußte daher nach einem Verfahren gesucht werden, das nicht so sehr die Wirkung der dem Serum zugesetzten Substanzen erhöhen als sie vielmehr verdeutlichen sollte.

Ein einfaches Heraufsetzen der Konzentration der oberflächenaktiven Stoffe war zur Erreichung dieses Zieles nicht angebracht. Ein derartiges Vorgehen hätte einen zu großen Eingriff in das Milieu der Eiweiße und Lipoproteide des Serums bedeutet und Denaturierungs- und Ausfällungsprozesse größeren Ausmaßes nach sich gezogen. Auch wäre eine Untersuchung des Einflusses der angeführten Substanzen auf Eiweiße und Lipoproteide in derart überhöhten Konzentrationen kaum noch von irgendwelchem Interesse gewesen.

Da sich herausstellte, daß die Genauigkeit in der Darstellung der Veränderungen im Lipoproteid- und Eiweißelektropherogramm durch einen gleichmäßigeren Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen während des Elektrophoresevorganges erhöht werden konnte, ergab sich nach mehreren Vorversuchen die folgende als die erfolgreichste Methode:

1. Wir fügten nicht nur dem Serum eine bestimmte Konzentration des in seiner Wirkung zu untersuchenden Stoffes, sondern auch dem zur Elektrophorese verwandten Veronal-Na-Puffer zu und zwar in derselben Konzentration, in der er auch im Serum vorhanden war.
   Nach Auftragen des Serums auf den zur Elektrophorese zu verwendenden Papierstreifen tränkten wir diesen in der erwähnten Pufferlösung und schlossen die Elektrophorese sofort an, indem die Verbindung zwischen Papierstreifen und Elektrode durch den - wie oben beschrieben - veränderten Puffer hergestellt wurde.
   Auf diese Weise enthielt das Serum, der im Puffer getränkte Papierstreifen und schließlich der zwischen Papierstreifen und Elektrode eingeschaltete Puffer dieselbe Konzentration des oberflächen-aktiven Stoffes. Durch ein derartiges Verfahren konnte ein ungefähr gleichbleibender Einfluß der betreffenden oberflächenaktiven Substanz auf das Gesamtserum auch während des Elektrophoresevorganges erzielt werden.
   Diese Abwandlung des Elektrophoreseverfahrens wurde sowohl auf die Fett- als auch auf die Eiweißelektrophorese angewandt.
   Natürlich bedeutet ein solches Verfahren - durch den zusätzlichen Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen auch während des Elektro-

phoresevorganges auf die einzelnen Fraktionen - eine Steigerung der Wirkungsmöglichkeit dieser Substanzen, die auch anhand der Ergebnisse deutlich zu erkennen ist. Sie führt jedoch in dem Konzentrationsbereich, in dem die auftretenden Veränderungen beobachtet wurden, nicht zu größeren feststellbaren Schädigungen der Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen.

2. Das normale Elektrophoreseverfahren wurde in einigen Fällen auch noch insofern etwas geändert, als wir zur Elektrophorese eine größere Serummenge, als allgemein üblich, verwandten. Hauptsächlich geschah dies dann, wenn Proteingruppen nachgewiesen werden sollten, die sich zusammen mit Lipoproteidfraktionen im Elektrophoresespektrum verschoben. Diese Proteingruppen waren bei Verwendung der normalen Serummenge von 0,015 ml zu schwach, um elektrophoretisch gegenüber den anderen Eiweißfraktionen nachgewiesen werden zu können. Wir verwandten daher in diesen Fällen 0,03 ml, und zwar sowohl zur Protein- wie auch zur Lipoproteidelektrophorese, die bei diesen Versuchen unter gleichen Bedingungen nebeneinander abgewickelt wurde und auch keine Verschiedenheit durch die aufgetragene Serummenge erfahren sollte.

3. Wie oben beschrieben, wurden zur Darstellung der Lipoproteide und Eiweiße zwei voneinander in Spannung und Stromstärke abweichende Verfahren benutzt. Beide Verfahren bringen im Grunde die gleichen Ergebnisse für Proteine und Lipoproteide; die verschiedenen Bedingungen bezwecken nur die bestmögliche Darstellung in dem einen Fall der Lipoproteide, in dem anderen der Proteinfraktionen.
Da es uns jedoch häufig darum ging, bei Veränderungen im Lipoproteidspektrum, das nach der dafür üblichen Methode gewonnen wurde, zu sehen, ob ihnen auch gleichlaufende Veränderungen in der Wanderungsstrecke und Lokalisation bestimmter Fraktionen im Proteinelektropherogramm entsprachen, mußten wir entweder denselben Elektrophoresestreifen anschließend oder einen zweiten parallel gelaufenen, der Proteinfärbung unterziehen. In den meisten Fällen benutzten wir bei diesen Untersuchungen breite Papierstreifen, die nach Abschluß des Verfahrens längs getrennt und teils der Protein-, teils der Fettfärbung unterzogen wurden, so daß für beide Teile genau gleiche Bedingungen gewährleistet waren. Ein Teil entsprach damit wie ein Spiegelbild dem anderen, nur daß auf dem einen die Proteine, auf dem anderen die Lipoproteide angefärbt worden waren.
Auf diese Weise war es möglich, genau zu beobachten, im Bereich welcher Eiweißfraktionen die Lipoproteidfraktionen nach Abschluß der Elektrophorese lagen und welche neu auftretenden Teilfraktionen im Eiweißelektropherogrammbild den in ihrer Lokalisation verschobenen Lipoproteidfraktionen entsprachen.
Entsprechend wurde natürlich auch vorgegangen, wenn primär Änderungen im Proteinelektropherogramm auftauchten und zum Vergleich der zweite Teil des Streifens der Lipoidfärbung unterworfen wurde. Zu quantitativen Bestimmungen wurden diese Vergleichsstreifen nicht herangezogen, sondern nur zu vergleichenden Beobachtungen der Wanderungsstrecke und Lokalisation der betreffenden Fraktionen, wozu auch unter diesen für die Vergleichsstreifen nicht

optimalen Bedingungen die Genauigkeit des Elektropherogrammbildes eine durchaus genügende Grundlage bildete. Daher wurden auch derartige Beispiele bei den Besprechungen der Versuche mit angeführt.
Um eine Störung des Elektropherogrammbildes der Eiweiße und Lipoproteide durch eine eventuelle Anfärbbarkeit der zugefügten Substanzen selbst mit einer der üblichen Färbemethoden auszuschließen, wurden diese Stoffe, bevor wir sie dem Serum zusetzten, als reine Substanz ebenfalls der Elektrophorese unterworfen, und zwar sowohl unter den Bedingungen der Fett- wie auch der Eiweißelektrophorese. Keine dieser Stoffe ließ sich jedoch nach Anwendung der üblichen Färbemethoden zur Darstellung der Eiweiße und Lipoide auf dem Elektrophoresepapier färberisch nachweisen, so daß ein Einfluß dieser Substanzen auf die Eiweiß- und Lipoproteidspektren durch Anfärbbarkeit und Darstellung ihrer selbst sich damit ausschloß.

4. Die Bestimmung der elektrophoretischen Wanderungsstrecke der einzelnen Fraktionen wurde auf dem mit Hilfe der Transparenzphotometrie gewonnenen Kurvenblatt vorgenommen, auf dem der Kurvenverlauf der Farbintensität der jeweiligen Fraktion parallel verläuft. Der obere Scheitelpunkt des einer Fraktion zugehörigen Kurvenabschnittes entspricht dann der größten Dichte der zu bestimmenden Fraktion und wurde ihrem Mittelpunkt gleichgesetzt. Von hier fällten wir das Lot auf die Basislinie. Der Abstand des Schnittpunktes dieses Lots mit der Basislinie vom Auftragsstrich des Serums ist in der vorliegenden Arbeit als Wanderungsstrecke der betreffenden Fraktion angegeben.
Lediglich bei Angaben über die Wanderungsstrecke der γ-Globulinfraktion wurde die weiteste sichtbare Ausdehnung dieser Fraktion kathodenwärts als deren Wanderungsstrecke angegeben. Dieses abweichende Verfahren wurde notwendig, weil eine Bestimmung der Wanderungsstrecke nach dem oben beschriebenen Verfahren wegen der größeren gleichmäßig dichten Ausdehnung der γ-Globulinfraktion und dadurch, daß in den meisten Fällen die kurvenmäßige Darstellung des Serum-Auftragsstriches in den Bereich dieser Fraktion fiel, eine Feststellung des Fraktionsmittelpunktes häufig nicht möglich war.

Ein Minuszeichen vor einer Wanderungsstreckenangabe deutet auf eine kathodische Ausdehnung der jeweiligen Fraktion hin. Dies trifft im allgemeinen nur für die γ-Globulinfraktion zu.

Untersuchungen mit Na-desoxycholicum

1. Versuch

In einem ersten Versuch setzten wir dem Serum einer gesunden Versuchsperson B 998) Na-desoxycholicum in ansteigenden Konzentrationen zu und unterzogen das Serum dann der normalen Eiweißelektrophorese.

Die durch diesen Versuch gewonnenen elektrophoretischen Streifen sind in Abb. 1 dargestellt.

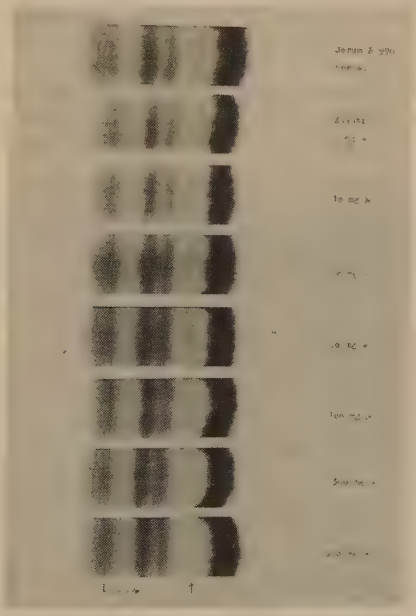
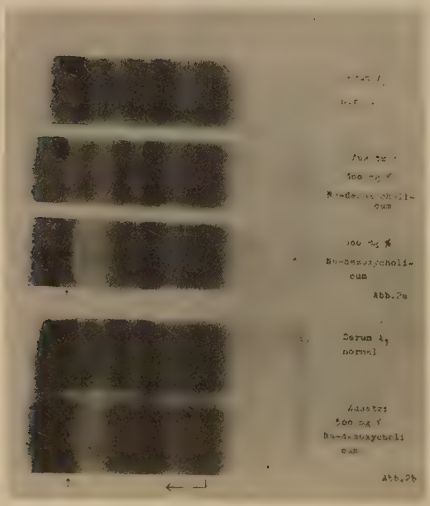


Abb. 1: Serum einer gesunden Versuchsperson (B 998) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum. Normale Proteinelektrophorese.

Als Ergebnis des ersten Versuches kann ein weitgehendes Verschwinden der α_1-Globulinfraktion bei der Konzentration von 500 mg % Na-Desoxycholicum im Serum unter den gegebenen Bedingungen der normalen Elektrophorese beobachtet werden.

Versuch 1a)

Zur Kontrolle dieses Befundes unternahmen wir den gleichen Versuch mit dem Serum mehrerer anderer gesunder Personen. Lediglich die Elektrophoresedauer wurde jetzt teilweise um 1 1/2 Std. erhöht. In 5 von 8 dieser Untersuchungen war die α_1-Globulinfraktion bei der Konzentration von 500 mg % Na-desoxycholicum im Serum auf dem Elektrophoresestreifen ebenfalls nicht mehr nachzuweisen. In 3 Fällen zeigte sie bei dieser Konzentration die aus den folgenden Abb. 2a, 2b, 2c ersichtliche anodische Verlagerung.



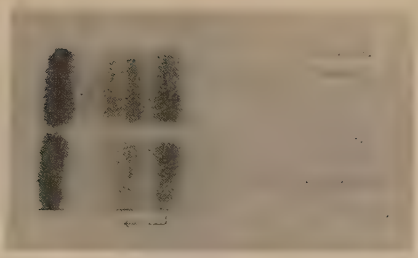


Abb. 2: Serum gesunder Versuchspersonen (A_1 A_2 Pr.) ohne und mit Zusatz von 500 mg % Na-desoxycholicum.
Normale Eiweißelektrophorese

Anhand der gefundenen elektrophoretischen Veränderungen muß angenommen werden, daß es sich bei dem Verschwinden der α_1-Globulinfraktion um ein Überwandern der α_1-Globuline in die Albuminfraktion handelt.

Auch die quantitative Auswertung einer solchen elektrophoretischen Untersuchung unterstützte diese Annahme. Die elektrophoretisch bestimmten Proteinfraktionsstärken unter den verschiedenen Konzentrationen von Na-desoxycholicum sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Na-desoxycholicum	Eiweißfraktionen (Rel. %)				
Co. (mg %)	Albuminfr.	α_1-	α_2-	ß-	γ-Globulinfr.
normales S.	66	3	7	10	14 %
20	66	3	7	10	14 %
50	66	3	7	10	14 %
100	62	3	7	12	16 %
500	60 4	1	8	11	16 %

Tabelle 2: Stärke der einzelnen Proteinfraktionen in % des Gesamteiweißgehaltes unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Na-desoxycholicum.
(Bedingungen der normalen Proteinelektrophorese).

Nur ein Teil (1 %) der α_1-Globuline bleibt bei der Konzentration von 500 mg % als ursprüngliche Fraktion am gewohnten Platz im Elektropherogramm zurück, der andere größere Teil wandert in Richtung zur Albuminfraktion vor. Bei Beurteilung der Werte für die Stärke der Albumin- und α_1-Globulinfraktion bei der Konzentration von 500 mg % Na-desoxycholicum im Serum muß jedoch berücksichtigt werden, daß durch das enge Zusammenliegen beider Fraktionen im Elektrophoresediagramm eine getrennte quantitative Bestimmung jeder einzelnen Fraktion nur annäherungsweise gelingen konnte.

Versuch 2:

Entsprechend dem Versuch 1 unterzogen wir das Serum einer gesunden Versuchsperson mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum auch der normalen Lipoproteidelektrophorese. Die Elektrophoresestreifen wurden nach Abschluß des Verfahrens längs geteilt und zur Hälfte der Lipoproteid- und der Proteinfärbung unterworfen. Von den so gewonnenen elektrophoretischen Diagrammen sind im folgenden 3 Beispiele dargestellt (s. Abb. 3).

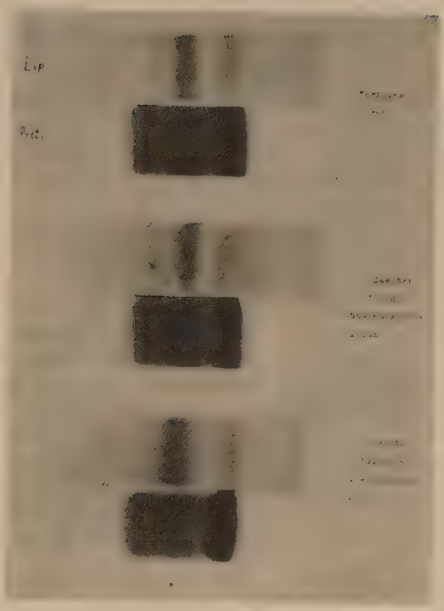


Abb. 3: Serum einer gesunden Versuchsperson (B 998) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Aus den Abbildungen ist deutlich ein Einfluß von Na-desoxycholicum auf die Wanderungsgeschwindigkeit der α -Lipoproteide ersichtlich.

Die Wanderungsgeschwindigkeit dieser Gruppe erhöht sich schon bei 10 - 20 mg % Na-desoxycholicum so stark, daß ein Teil schließlich vor der Albuminfraktion wandert, bis bei der Konzentration von 50 mg % die gesamte α-Lipoproteidfraktion vor die Albumine zu liegen kommt, wie es sich aus der vergleichenden Eiweißfärbung ergibt (s. Abb. 3).

Die besondere Wirkung des Na-desoxycholicum auf die Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide zeigte sich auch nach Ausmessung der Wanderungsstrecke der Lipoproteidfraktionen nach Abschluß der Elektrophorese. Eine Übersicht darüber s. Tab. 3.

Na-desoxy-cholicum	Lipoproteidfraktionen Wanderungsstrecke (cm)		
Co. (mg %)	Vorfr.	α-Lip.	ß-Lipopr.fr.
normal. Ser.		4,6	1,8 cm
5 mg %		4,5	1,9
10 mg %	5,7	4,6	1,8
20 mg %	5,7	4,5	1,7
50 mg %	5,8		2,0
100 mg %	5,9		2,0

Tab. 3: Wanderungsstrecke der Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum. Normale Lipoproteidelektrophorese.

Unter der Konzentration von 100 mg % Na-desoxycholicum im Serum wird die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide um 28 % gesteigert, während die Wanderungsgeschwindigkeit der meisten Eiweißfraktionen bei dieser Konzentration im Normalbereich bzw. noch unterhalb ihres Normalwertes liegt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der ß-Lipoproteide wird unter denselben Bedingungen um 11 % erhöht.

Die quantitative Bestimmung der Fettfraktionen während des Vorwanderns der α-Lipoproteide bis zu ihrem Auftreten als "Vorfraktion" (Bezeichnung s. SCHETTLER-SCHÖLL (44)) vor den Albuminen, ergab folgende Werte:

Na-desoxycholicum	Lipoproteidfraktionen Fraktionsstärke (Rel. %)		
Conc. (mg %)	Vorfr.	α -Lipoprot.	ß-Lipopr.fr.
normales Serum		25	75
5		28	72
10	17	11	72
20	21	8	71
50	28		72
100	17		83
300	10		90

Tab. 4: Serum mit ansteigenden Konzentrationen Na-desoxycholicum. Normales Lipoproteidelektrophoreseverfahren.

Das annähernd gleichbleibende Verhältnis zwischen der ß-Lipoproteidfraktion einerseits und der α -Lipopr.fr. + Vorfraktion andererseits ist ein weiterer Hinweis dafür, daß es sich bei dem Auftreten von drei Fettfraktionen tatsächlich nur um eine Aufteilung der α-Lipoproteide handelt und die Vorfraktion nur der vorgewanderte Teil der α-Lipoproteidfr. ist. Das spätere Abfallen der α-Lipoproteide (ab der Konzentration von 100 mg %) und entsprechende Ansteigen der ß-Lipoproteide möchten wir so erklären, daß denaturierte α-Lipoproteide in ihrer Wanderungsfähigkeit so beeinträchtigt sind, daß sie im Bereich der ß-Lipoproteide wandern oder am Auftragsstrich liegen geblieben sind und damit bei den α -Lipoproteiden fehlen bzw. den ß-Lipoproteiden zugezählt werden.

Um die unter dem Einfluß von Na-desoxycholicum-Zusatz zum Serum beobachteten elektrophoretischen Veränderungen durch eine gleichmäßigere Einwirkung der Gallensäuren auf die Lipoproteid- und Proteinfraktionen auch während des Elektrophoreseverfahrens schärfer zu erfassen, wandelten wir das bisher benutzte Verfahren ab. Wir fügten Na-desoxycholicum jetzt nicht nur dem Serum, sondern auch dem zur Elektrophorese verwandten Puffer in entsprechend ansteigenden Konzentrationen zu (nähere Angaben s. Abschnitt Methodik "Abgewandelte Elektrophorese".

Versuch 3 u. 4

Mit Hilfe des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens untersuchten wir sowohl das Protein- wie auch das Lipoproteidspektrum des Serums gesunder Versuchspersonen (A_2 u. Pa.) nach Zusatz von ansteigenden Konzentrationen Na-desoxycholicum.

Die so gewonnenen Elektrophoresestreifen s. Abb. 4 u. 5.

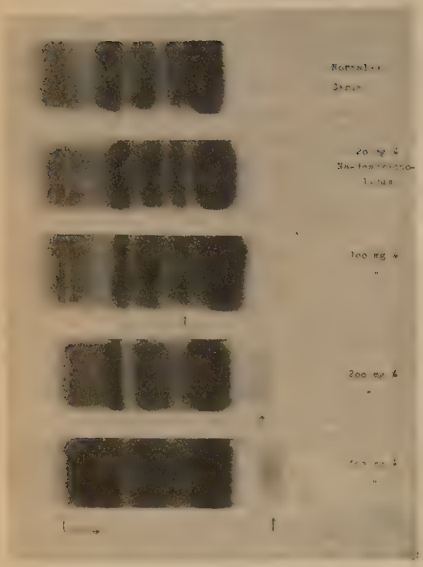


Abb. 4: Serum einer gesunden Versuchsperson (A 2) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum.

Abgewandelte Proteinelektrophorese.

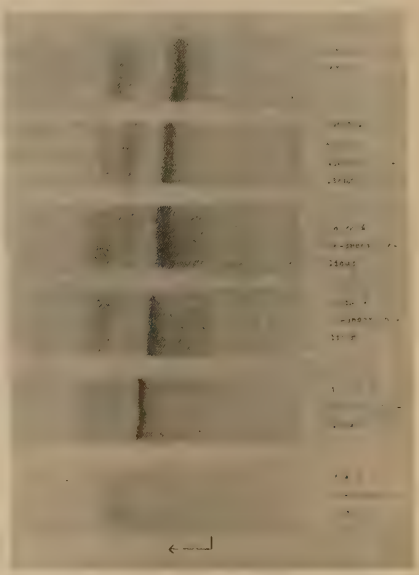


Abb. 5: Serum einer gesunden Versuchsperson (Pa.) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum.

Abgewandelte Lipoproteidelektrophorese.

Aus den Abbildungen 4 und 5 geht deutlich hervor, daß es bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese unter dem Einfluß von Na-desoxycholicum nicht nur zum Auftreten einer Lipoproteid-, sondern auch einer Eiweiß-Vorfraktion kommt.

Es kann sich bei den beiden Vorfraktionen im Eiweiß- und Lipoproteidelektropherogramm nicht um die gleiche Fraktion handeln, von der nur einmal der Lipoid- das andere Mal der Proteinanteil dargestellt ist, denn die Vorfraktion der Lipoproteide verlagert sich wesentlich früher vor die Albumine als die der Eiweiße. Bei der Konzentration von 10 mg % Na-desoxycholicum, bei der nur eine färberisch kaum faßbare Spur von Eiweißkörpern vor den Albuminen sichtbar ist, beginnt die Vorwanderung der α-Lipoproteide vor die Albumine und ist bei der Konzentration von 50 mg % abgeschlossen (s. Abb. 5). Die Vorfraktion der Eiweiße tritt dagegen im allgemeinen erst deutlich sichtbar bei der Konzentration von 100 - 200 mg % auf und erreicht ihr Maximum bei 300 mg % Na-desoxycholicum (s. Abb. 4).

Unter dem Einfluß von Na-desoxycholicum wird auch die ß-Lipoproteidfraktion so sehr beschleunigt, daß sie bei der Konzentration von 300 mg % Na-desoxycholicum ebenfalls vor die Albuminfraktion zu liegen kommt (s. Abb. 5). Es läßt sich aber einwandfrei zeigen, daß die Vorfraktion der Eiweißkörper auch nicht dieser Lipoproteidfraktion entspricht, wie die Abb. 6 d zeigt.

Versuch 4 a

Um dies Verhalten zu demonstrieren, wurde Serum einer gesunden Versuchsperson (A 2) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum unter den Bedingungen der abgewandelten Lipoproteidelektrophorese untersucht. Die Papierstreifen wurden nach der Elektrophorese längs geteilt und jeweils eine Hälfte der Protein- die andere der Lipoproteidfärbung unterzogen (s. a. methodische Angaben).

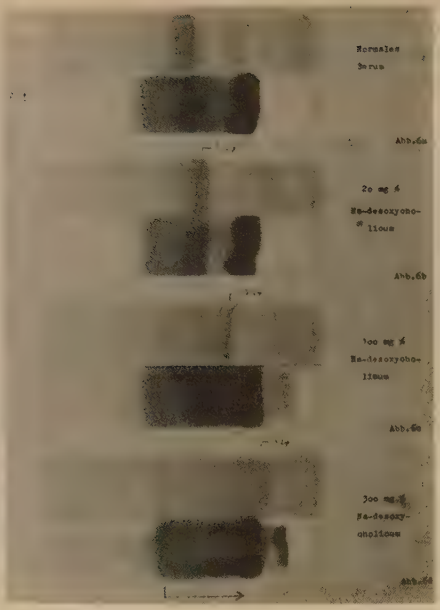


Abb. 6: Serum einer gesunden Versuchsperson (A 2) mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum. Abgewandelte Lipoproteidelektrophorese. Die Elektrophoresestreifen wurden längs geteilt und eine Hälfte der Eiweiß- die andere der Lipoproteidfärbung unterzogen.

Die unabhängige Lagerung der bei der Konzentration von 300 mg % vor den Albuminen sichtbaren ß-Lipoproteidfr. von der schon bei 100 mg % deutlich sichtbaren Eiweißfraktion geht aus den Elektrophoresestreifen der Abb. 6 d hervor.

Man kann damit feststellen:

Daß beide Vorfraktionen die bei Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens darzustellen sind: die der Lipoproteide und der Eiweiße zwei voneinander unabhängige Fraktionen sind.

Das schließt jedoch nicht aus, daß der Proteinanteil der Vorfraktion der α-Lipoproteide in die der Eiweiße mit einbezogen ist, nur stellt er dann einen geringen Teil dieser Fraktion, während der bedeutend größere Teil durch selbständig vorgewanderte Teile des Proteinspektrums gebildet wird.

Die quantitative Auswertung der Protein- und Lipoproteidelektrophoresestreifen des Serums einer gesunden Versuchsperson mit Zusatz von ansteigenden Konzentrationen Na-desoxycholicum ist in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt. In ihr wurde die Überlagerung der Eiweißfraktionen durch die sich unter der Wirkung von Na-desoxycholicum anodenwärts verlagernde ß-Lipoproteidfr. dadurch bezeichnet, daß die ß-Lipoproteidfr. im Bereich der jeweils von ihr überlagerten Eiweißfraktionen durch eine Marke angedeutet wurde.

Na-desoxycholicum	Proteinfraktionen Fraktionsstärke Rel.%						Lipoproteidfr. Fraktionsstärke rel%		
Konzentrt. mg%	Vorfrkt.	Alb.	α_1	α_2	ß-	γ - Glob.fr.	Vorfrkt.	α-Lip.	ß-Lip.
Norm.S.		56	2,6	9,3	14,0	18,1		32	68
5		58	2,3	10	11,6	18,1	10	24	66
10		59	3,2	10,3	9,3	18,2	16	19	65
20		59	2,3	9,8	10,3	18,6	19	14	67
50		59,3	3,1	9,8	10,3	17,5	28		72
75		57	2,9	10,3	9,8	17,2			
100		57,2	2,8	12,3	6,3	16,4	24		76
300	0,5	67	3,9	8,6	9,6	10,4			
500	1,3	67	3,0	8,7	11,3	8,7			

Tabelle 5: Stärke der Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese. Durch die eingezeichneten Marken wird die Überlagerung der Eiweißfraktionen durch die ihre Lokalisation ändernde ß-Lipoproteidfraktion angedeutet. Die anodische Wanderung der ß-Lipoproteide ist zu erkennen.

Bei Bewertung der Tabelle über die quantitative Zusammensetzung der Proteinelektropherogramme ist über die an sich bestehende methodische Fehlerbreite bei Auswertung eines Elektropherogramms (für unser Verfahren angegeben in 69) noch der nachteilige Umstand zu berücksichtigen, daß unter der Einwirkung höherer Konzentrationen oberflächenaktiver Substanzen die Fraktionsgrenzen der Proteine sich etwas unklarer voneinander absetzen, so daß die Grenzbestimmung zwischen den einzelnen Banden im Elektropherogramm nicht ganz so scharf wie bei der Elektrophorese von Normalseren erfolgen kann.

Wir führen diese tabellarische Übersicht über die Proteinfraktionsstärken jedoch an, da wir die im folgenden zu besprechenden Veränderungen auch bei Wiederholung des Versuches mit anderen Seren immer wieder vorfanden und sie daher nicht unerwähnt bleiben sollen.

In der Tabelle fällt mit Verlagerung der ß-Lipoproteidfraktion aus dem Bereich der ß-Globuline eine Abnahme der Stärke dieser Fraktion auf. Entsprechend der anodischen Wanderung der ß-Lipoproteide unter dem Einfluß ansteigender Na-desoxycholicum-Konzentrationen ist eine Zunahme der Stärke der jeweils von der ß-Lipoproteidfraktion überlager-

ten Proteinfraktion hinlänglich zu erkennen, geringer im α_2-Globulinbereich, sehr viel deutlicher im α_1-Globulin- und Albuminbereich. Auf diesem Wege ist aber nur das Vorwandern von 3 - 5 % der Gesamteiweißmenge aus der ß-Globulinfraktion zu verfolgen. Das erklärt aber das Anwachsen der Albuminfraktion auf 67 % nicht in genügendem Maße. Man muß annehmen, daß dieser Zuwachs der Albuminfraktion durch selbständig vorgewanderte Teile aller Globulinfraktionen entsteht, das seinen Ausdruck auch in der deutlichen Abnahme der übrigen Globulinfraktionen findet, wobei wahrscheinlich die Verluste der α_2- und ß-Globuline zum Teil durch vorgewanderte Teile der γ-Globulinfraktion gedeckt werden. Auf diese Weise ist auch der starke Abfall der γ-Globulinfraktion erklärlich, weil es die Fraktion ist, die durch vorwandernde Teile anderer Fraktionen nicht aufgefüllt werden kann.

Es kann also mit hoher Wahrscheinlichkeit festgestellt werden:

Die anodische Verlagerung der ß-Lipoproteide während der Elektrophorese unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-desoxycholicum beeinflußt im Elektropherogramm der Eiweiße die quantitativen Verhältnisse im Sinne der Erhöhung der Fraktionsstärke der von den ß-Lipoproteiden im Elektropherogramm jeweils überlagerten Proteinfraktion.

Die Annahme liegt nahe, und wird später noch zu diskutieren sein, daß es sich bei der die ß-Lipoproteide begleitenden Proteingruppe um den Proteidanteil dieser Lipoproteidfraktion handelt.

Ergebnisse der Untersuchungen mit Na-desoxycholicum

1) Na-desoxycholicum besitzt eine bevorzugt die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit beider Lipoproteidfraktionen beschleunigende Wirkung.

2) Bei höherer Na-desoxycholicum-Konzentration im Serum kann die Bildung einer Lipoproteid- und Eiweiß-Vorfraktion vor den Albuminen beobachtet werden, deren Auftreten zum größten Teil unabhängig voneinander erfolgt.

3) Bei der durch die erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteidfraktionen bedingten anodischen Verlagerung der ß-Lipoproteide kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Fraktionsstärke der jeweils im Elektropherogramm überwanderten Proteinfraktion.

4) Bei der Konzentration von 500 mg % Na-desoxycholicum im Serum kommt es zu einem Verschwinden der α_1-Globulinfraktion im Elektropherogramm. Aus den abgebildeten Elektrophoresestreifen kann man schließen, daß die α_1-Globuline in die Albuminfraktion überwandern.

Untersuchungen mit Na-dehydrocholicum

Vers. 5; 6;

Entsprechend dem Vorgehen bei den Untersuchungen mit Na-desoxycholicum unterzogen wir auch Seren mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum der Eiweiß- und Lipoproteidelektrophorese.

Dabei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Im Elektropherogramm der Proteine und Lipoproteide eines Serums mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum sind keine quantitativen Änderungen zu beobachten.

Für die Änderungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum ist als Beispiel in der folgenden Tabelle 6 die Wanderungsweite der Lipoproteid- und Proteinfraktionen unter dem Einfluß bestimmter Konzentrationen dieser Gallensäure nach Abschluß des Elektrophoresevorganges angegeben:

Na-dehydrocholicum	Eiweißfraktionen Wanderungsstrecke (cm)					Lipoproteidfraktionen Wanderungsstrecke cm		
Co.(mg)	Alb.	α_1-	α_2-	ß-	γ-Glob.fr.	α-Lip.	ßLip.	cm
norm.	5,2	3,9	2,8	1,7	-1,3	3,0	0,7	cm
5	5,1	3,8	2,8	1,7	-1,3	2,9	0,6	cm
10	5,2	3,8	2,8	1,6	-1,5	3,1	0,8	cm
20	5,3	3,9	2,8	1,6	-1,5	3,1	0,9	cm
50	5,4	4,0	2,9	1,6	-1,5	3,1	0,9	cm
100	5,4	4,0	2,8	1,6	-1,6	3,1	0,9	cm
300	5,7	4,2	3,0	1,7	-1,6	3,2	0,8	cm
500	5,7	4,5	3,0	1,7	-2,0	3,2	0,8	cm

Tabelle 6: Elektrophoretische Wanderungsstrecken der Protein- und Lipoproteidfraktionen unter Einfluß ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum.
(Normale Protein- und Lipoproteidelektrophorese.)

Nach Zusatz von Na-dehydrocholicum zum Serum kann eine fast alle Fraktionen betreffende Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit geringen Umfanges festgestellt werden. Eine Ausnahme bildet allein die ß-Globulinfraktion.

Ihre Wanderungsgeschwindigkeit wird bis zur Konzentration von 100 mg % erniedrigt und erst bei 300 mg % der ursprüngliche Wert wieder erreicht. Aus der Tabelle geht außerdem hervor, daß die Albumin- und α_1-Globulinfraktion, dazu beide Lipoproteidfraktionen bei den anfänglichen Konzentrationen von 5- und teilweise 10 mg % ebenfalls einen Abfall ihrer Wanderungsstrecke aufweisen.

Vers. 7; 8;

Auch nach Anwendung des abgewandelten Verfahrens für die Protein- und Lipoproteidelektrophorese von Seren mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-dehydrocholicum konnten keine Änderungen im quantitativen Verhalten der Fraktionen beobachtet werden.

Die Beobachtung der Wanderungsgeschwindigkeit erbrachte bei Anwendung dieses Verfahrens keine neuen Gesichtspunkte. Es kam lediglich bei Konzentrationen über 300 mg % Na-dehydrocholicum im Serum zu einem Abfall der Wanderungsstrecke im Protein- und Lipoproteidelektropherogramm, den wir auf Denaturierungserscheinungen der kolloidalen Substanzen durch die hohen Gallensäurekonzentrationen im Serum zurückführen möchten.

Ergebnisse der Untersuchungen mit Na-dehydrocholicum

1) Nach Zusatz ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum zu verschiedenen Blutseren sind quantitative Änderungen im Protein- und Lipoproteidelektropherogramm nicht festzustellen.

2) Unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Na-dehydrocholicum im Serum wird eine mäßige elektrophoretische Wanderungsbeschleunigung aller Protein- und Lipoproteidfraktionen mit Ausnahme der im wesentlichen unbeeinflußten ß-Globulinfraktion beobachtet.

Untersuchungen mit Glykocholsäure und Na-cholalicum

Glykocholsäure und Na-cholalicum verhielten sich in der Art und Stärke ihrer Wirkung so ähnlich, daß sie an dieser Stelle gemeinsam besprochen werden können.

Vers. 9;

In einem ersten Versuch unterzogen wir das Serum C1, dem in ansteigenden Konzentrationen Glykocholsäure zugesetzt worden war, der normalen Lipoproteidelektrophorese. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Elektrophoresestreifen längsgeteilt und eine Hälfte der Fett- die andere der Proteinfärbung unterworfen, um die den Lipoproteidfraktionen entsprechende Lokalisation der Proteinfraktionen jeweils genau feststellen zu können. Bei diesem Versuch konnte beobachtet werden, daß es

> parallel der Konzentrationssteigerung von Glykocholsäure im Serum zu einer langsamen Verlagerung der α-Lipoproteide vor die Albuminfraktion mit dem entsprechenden Auftreten einer Lipoproteid-Vorfraktion im Elektropherogramm kommt.

Dieser Vorgang begann bei der Konzentration von 10 mg % Glykocholsäure im Serum und war bei der Konzentration von 50 mg % beendet.

Vers. 10;

In den dem Versuch 9 entsprechenden Untersuchungen eines Serums diesmal mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-cholalicum konnten ähnliche Feststellungen gemacht werden. Die drei bezeichnendsten Elektrophoresediagramme dieser Untersuchung sind in Abb. 7 dargestellt. Es wurden wieder die unter den Bedingungen der Lipoproteidelektrophorese gewonnenen Elektrophoresestreifen längs geteilt und je zur Hälfte der Eiweiß- und Lipoproteidfärbung unterworfen. Es ist daher durchaus verständlich, daß in den hier angeführten Proteinelektrophoresestreifen, die unter den Bedingungen der Lipoproteidelektrophorese gewonnen wurden, die einzelnen Proteinfraktionen gegeneinander nur sehr ungenau abzugrenzen sind. Es ging uns bei der Eiweißfärbung dieser Elektrophoresestreifen lediglich darum, die Stellung der Albuminfraktion zu den α-Lipoproteiden zu erkennen, was aus der Abbildung auch mit hinlänglicher Sicherheit möglich ist.

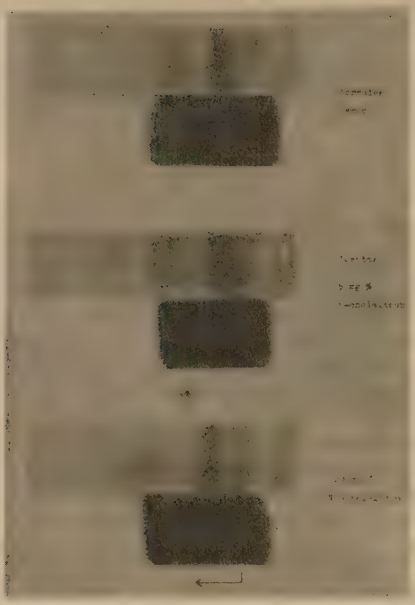


Abb. 7: Serum C 1 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Na-cholalicum. Normale Lipoproteidelektrophorese.
(Eine Hälfte der Elektrophoresestreifen wurde der Proteinfärbung unterzogen).

Aus den Abb. ist gut zu erkennen, daß es auch unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Na-cholalicum im Elektrophergramm zu einer Verlagerung der α-Lipoproteide vor die Albuminfraktion kommt, die bei der Konzentration von 5 mg % beginnt und bei 20 mg % fast vollständig ist. Die α-Lipoproteidfraktion wandert dann als Vorfraktion vor den Albuminen.

Vers. 11;

Die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinfraktionen eines Serums C 2 nach Zusatz von ansteigenden Konzentrationen Na-cholalicum zum Serum unter den Bedingungen der normalen Proteinelektrophorese ist anhand der Wanderungsstrecke der Eiweißfraktionen nach Abschluß des Elektrophoreseverfahrens in der Tabelle 7 zusammengestellt. Daneben ist auch die Wanderungsstrecke der Lipoproteidfraktionen desselben Serums unter den Bedingungen der normalen Lipoproteidelektrophorese in der Tabelle aufgeführt.

Na-cholalicum	Proteinfraktionen Wanderungsstrecke (cm)					Lipoproteidfr. Wanderungsstrecke (cm)		
Konztrt. (mg %)	Albumin-fr.	α_1-	α_2-	ß-	γ-Glob. fr.	Vor-fr.	α-Lip.	ß-Lip.fr.
norm. Ser.	5	3,7	2,6	1,5	1,2		2,5	0,8
5	5,1	3,9	2,8	1,7	1,3	3,6	2,6	0,9
10	5,1	3,7	2,7	1,7	1,2	3,6	2,6	0,9
20	5,2	3,9	2,8	1,8	1,3	3,7	2,6	1,0
50	5,2	4,0	2,9	1,8	1,3	3,7		1,0
100	5,3	4,0	3,0	1,8	1,4	3,7		1,0
300	5,4	4,1	2,9	1,5	1,3			

Tabelle 7: Elektrophoretische Wanderungsstrecke der Protein- und Lipoproteidfraktionen des Serums C 2 unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-cholalicum.
Normale Protein- und Lipoproteidelektrophorese.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen kann festgehalten werden:

Parallel dem Anstieg der Konzentration von Na-cholalicum im Serum kommt es zu einer Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide mit dem entsprechenden Auftreten dieser Fraktion als Vorfraktion vor den Albuminen, der ß-Lipoproteide, der Albumine, der α_1- und α_2-Globulinfraktion.

Schwankungen ihrer Wanderungsstrecke weisen die ß- und γ-Globulinfraktion auf.

Entsprechende Beobachtungen konnten auch bei der Untersuchung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Protein- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Glykocholsäure gemacht werden.

Bei der quantitativen Auswertung der Protein- und Lipoproteidelektropherogramme wurden

quantitative Änderungen der Protein- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Glykocholsäure und Na-cholalicum im Serum nicht festgestellt.

Dies traf natürlich nur dann zu, wenn wir die unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen beider Gallensäuren anodenwärts sich verlagernde und dabei vorübergehend in zwei Teile aufspaltende α-Lipoproteidfraktion in ihren beiden Teilen als eine Fraktion betrachteten und als Gesamtfraktion der ß-Lipoproteidfraktion gegenüberstellten.

Ergebnisse der Untersuchungen mit Glykocholsäure und Na-cholalicum

1) Unter der Wirkung ansteigender Konzentrationen von Glykocholsäure und Na-cholalicum ist eine alle Protein- und Lipoproteidfraktionen betreffende Erhöhung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zu beobachten. Schwankungen der Geschwindigkeitszunahme zeigen die ß- und γ-Globulinfraktion.

2) Parallel der Konzentrationszunahme beider Gallensäuren im Serum kommt es im Elektropherogramm der Lipoproteide zu einer Verlagerung der α-Lipoproteidfraktion vor die Albumine mit dem entsprechenden Auftreten dieser Fraktion als "Vorfraktion" vor den Albuminen.

3) Quantitative Änderungen der Protein- bzw. Lipoproteidfraktionen sind unter der Einwirkung von Glykocholsäure und Na-cholalicum im Elektropherogramm nicht zu beobachten.

Übersicht über die Ergebnisse der Versuche mit Gallensäuren

1) Unter dem Einfluß der den Blutseren "in vitro" zugefügten Gallensäuren ist bei der Lipoproteidelektrophorese eine Beschleunigung der anodischen Wanderung beider Lipoproteidfraktionen zu beobachten.

2) Diese elektrophoretische Wanderungsbeschleunigung betrifft bei allen Untersuchungen außer bei Anwendung von Na-dehydrocholicum insbesondere die α-Lipoproteidfraktion und führt zu ihrer Verlagerung im Elektropherogramm vor die Albuminfraktion und damit zur Bildung einer vor den Albuminen nachweisbaren Lipoproteid-Vorfraktion.

3) Nach Zufügen der erwähnten Gallensäuren zu Blutseren ist in der Regel eine dem Konzentrationsanstieg der Gallensäuren entsprechende elektrophoretische Wanderungsbeschleunigung auch der Proteinfraktionen nachzuweisen.

4) Unter dem Einfluß höherer Konzentrationen von Na-desoxycholicum im Serum und bei Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens kommt es dadurch zum Auftreten auch einer vor den Albuminen gelegenen Eiweiß-Vorfraktion, deren Bildung zum größten Teil unabhängig von der der Lipoproteid-Vorfraktion erfolgt.

5) Quantitative Änderungen der Proteinfraktionen unter dem Einfluß höherer Konzentrationen von Na-desoxycholicum bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese müssen in Verbindung gebracht werden mit der parallel dem Konzentrationsanstieg der Gallensäuren verlaufenden anodischen Verlagerung der ß-Lipoproteidfraktion im Elektropherogramm. Erklärt werden diese quantitativen Verschiebungen im Eiweißspektrum dadurch, daß die jeweils von der ß-Lipoproteidfraktion im Elektrophergramm überlagerten Eiweißfraktion wahrscheinlich durch deren Proteidanteil eine Erhöhung ihrer Fraktionsstärke erfährt.

6) Bei der Konzentration von 500 mg % Na-desoxycholicum im Serum ist α_1-Globulinfraktion im Proteinelektropherogramm nicht mehr nachweisbar. Es muß dabei ein Überwandern dieser Fraktion in die Albuminfraktion angenommen werden.

Versuche mit anderen oberflächenaktiven Substanzen

Nachdem unter der Wirkung der Gallensäuren im Elektropherogramm der Proteine und Lipoproteide deutliche Abweichungen vom normalen elektrophoretischen Verhalten dieser Fraktionen zu beobachten waren, stellte sich die Frage, welche Ursachen diesen Änderungen zu Grunde lagen.

Es mußte dabei in erster Linie an die allen Gallensäuren gemeinsame oberflächenaktive Wirkung gedacht werden. Wenn eine derartige Wirkung der Gallensäuren auch vorausgesetzt werden konnte, so war doch zu fragen, ob alle oder welcher Teil der Änderungen im Elektropherogramm durch sie hervorgerufen würden. Auch konnten auf Grund der bisherigen Versuche keine Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der Gallensäuren bzw. ihrer Oberflächenaktivität entwickelt werden. Von GORDON (17) wurde seinerzeit die Bedeutung der elektrischen Ladung oberflächenaktiver Körper für die Veränderungen im Lipoproteid-Elektropherogramm hervorgehoben. Ob ihr auch in unserem Falle eine wesentliche Bedeutung für die Wirkung der Gallensäuren zukam und ob sich auch die Änderungen im Elektropherogramm der Eiweiße auf ihren Einfluß zurückführen ließen, wollten wir durch weitere Versuche klären. Wir wählten daher drei andere ebenfalls oberflächenaktive Substanzen aus, deren weitere Eigenschaften wie z. B. ihre elektrische Ladung gut bekannt waren. Es waren dies das anionische Na-oleat, Tween 80 als neutraler Körper und das kationische Zephirol. Mit ihnen unternahmen wir in gleicher Weise und unter denselben Bedingungen Versuche wie mit den Gallensäuren. Sie werden in Folgendem besprochen.

Untersuchungen mit Na-oleat

Vers. 12;

Das Serum einer gesunden Versuchsperson AII wurde mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat versehen und der normalen Lipoproteidelektrophorese unterzogen. Die bei dieser Untersuchung gewonnenen Elektrophoresediagramme sind in Abb. 8 angeführt.

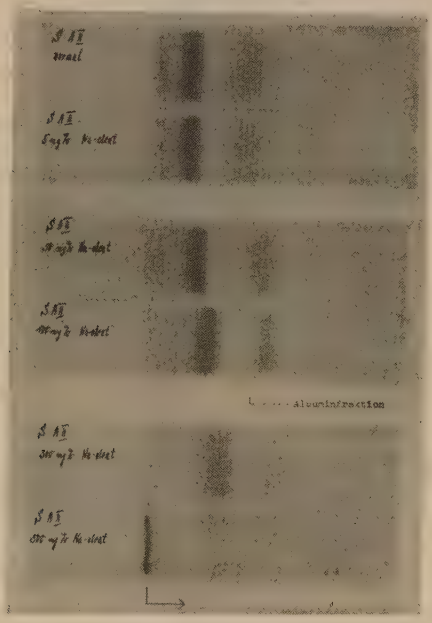


Abb. 8: Serum A II mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Aus den abgebildeten Lipoproteidelektropherogrammen ist zu ersehen, daß es unter der Wirkung ansteigender Konzentrationen Na-oleat im Serum zu einer starken elektrophoretischen Beschleunigung beider Lipoproteidfraktionen kommt. Durch diese intensive elektrophoretische Beschleunigung wandert die α-Lipoproteidfraktion von der Konzentration von 50 mg % Na-oleat im Serum ab im Elektropherogramm vor der Albuminfraktion und tritt als Lipoproteid-Vorfraktion in Erscheinung.

Die Wanderungsstrecken der Lipoproteidfraktionen nach Abschluß der Elektrophorese sind in Abhängigkeit von der Konzentration des Na-oleats im Serum in der folgenden Tabelle zusammen mit den Fraktionsstärken der Lipoproteide aufgeführt:

Na-oleat Konzentration (mg %)	Lipoproteidfraktionen				
	Wanderungsstrecke (cm)			Fraktionsstärke (Rel. %)	
	Vor.fr.	α-Lip.	ß-Lip.	α-Lip.	ß-Lip.
Normal. Ser.		3,4	1,2	23	77
5		3,6	1,2	23	77
10		3,5	1,2	22	78
20		3,7	1,3	23	77
50	4,7		1,7		
100	4,9		2,3	25	75
300	5,2		3,1	25	75
500	5,2		3,2		

Tabelle 8: Elektrophoretische Wanderungsstrecke und Stärke der Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Na-oleat.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Aus Tabelle 8 ergibt sich,
daß die ß-Lipoproteidfraktion durch Na-oleat eine größere Wanderungsbeschleunigung erfährt als die α-Lipoproteidfraktion. So zeigt sie bei der Konzentration von 100 mg % Na-oleat im Serum eine Zunahme von 1,1 cm Wanderungsstrecke gegenüber ihrem Ausgangswert ohne Zusatz von Na-oleat,
das entspricht einer Wanderungsbeschleunigung von 92 %. Die α-Lipoproteidfraktion weist unter den gleichen Bedingungen eine Zunahme der Wanderungsstrecke von 1,5 cm auf, die einer Erhöhung der Wanderungsgeschwindigkeit von nur 44 % entspricht.

Wesentliche Änderungen der Fraktionsstärken beider Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-oleat im Serum sind im Elektropherogramm nicht festzustellen.

Vers. 13;

Im folgenden Versuch 13 wurde das gleiche Serum A II mit Zusatz ansteigender Konzentration Na-oleat im Serum unter den Bedingungen der normalen Proteinelektrophorese untersucht. Die gewonnenen Elektrophoresestreifen sind in Abb. 9 dargestellt.

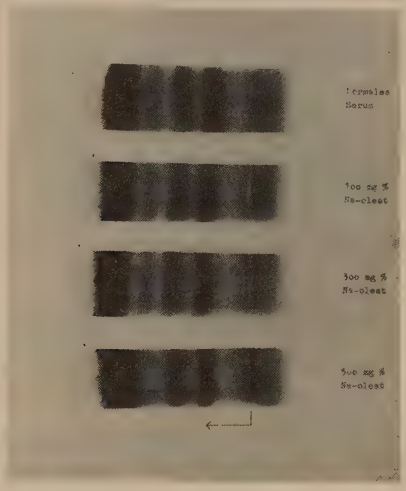


Abb. 9: Serum A II mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat.
Normale Proteinelektrophorese.

Als Ergebnis dieser Untersuchung konnte
die Bildung einer nur schwach anfärbbaren im Elektropherogramm vor den Albuminen gelegenen Protein-Vorfraktion beobachtet werden.

Die quantitative Auswertung dieses Versuches erbrachte die in Tabelle 9 aufgeführten Proteinfraktionsstärken. (Die ausgewerteten Proteinelektrophoresestreifen wurden der Langzeitfärbmethode unterworfen. Diese Methode ergibt zwar eine wesentlich größere Stärke der Globulinfraktionen gegenüber den Albuminen, sie wurde aber der sonst angewandten Kurzzeitfärbung vorgezogen, um eine möglichst gute Anfärbung der Protein-Vorfraktion zu erzielen.)

Na-oleat	Proteinfraktionen Fraktionsstärke Rel. %					
Co. (mg %)	Vor. fr.	Alb. -fr.	α_1-	α_2-	ß-	γ-Glob. fr.
norm.		34,5	10,2	16,7	18,4	20,2
10		33,0	10,3	17,0	19,7	20,0
100	1,4	31,0	10,0	17,4	20,1	20,1
300	1,0	33,0	11,7	18,8	17,7	17,8
500	1,7	34,0	8,4	16,8	15,6	7,5-6.-10

Tabelle 9: Stärke der Proteinfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Na-oleat im Serum.

Außer dem Auftreten der Eiweiß-Vorfraktion zeigt die Tabelle 9 sonst keine erheblichen Veränderungen der Stärke der einzelnen Fraktionen. Die Aufteilung der γ-Globuline in drei Teilfraktionen bei der Konzentration von 500 mg % Na-oleat im Serum wurde vorgenommen, um die mittlere Fraktion von 6 % eliminieren zu können, da sie offensichtlich die bei dieser Konzentration von 500 mg % denaturierten und am Auftragsstrich liegen gebliebenen Eiweißkörper darstellt (s. Abb. 9).

Mit dieser Ausfällung von Proteinen bei hohen Konzentrationen von Na-oleat muß auch die Abnahme der Stärke der α_1- und ß-Globulinfraktion in Zusammenhang gebracht werden. Gleichzeitig ist bei der ß-Globulinfraktion zu berücksichtigen, daß sie mit dem Vorwandern der ß-Lipoproteide, das bei entsprechender Fettanfärbung deutlich beobachtet werden kann, wahrscheinlich eines wenn auch geringen Teils ihrer Proteine - nämlich des Proteidanteils dieser Fraktion - verlustig geht.

Vers. 14;

Um uns über das Entstehen der Protein-Vorfraktion genauer zu orientieren, wandten wir auch das abgewandelte Elektrophoreseverfahren an.

Die Elektrophoresestreifen, die unter Benutzung des Serums A II mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat bei Anwendung der abgewandelten Proteinelektrophorese gewonnen wurden, sind in Abb. 10 dargestellt.

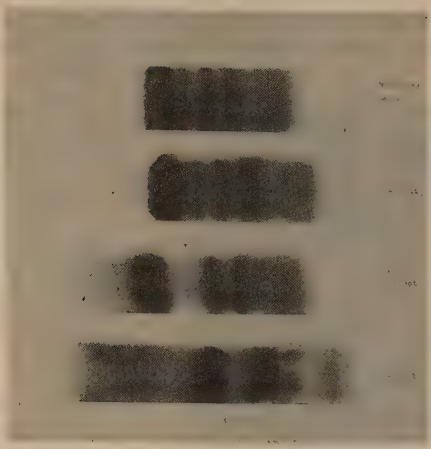


Abb. 10: Serum A II mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.

Aus der Abbildung 10 geht hervor,
daß es unter dem Einfluß hoher Konzentrationen Na-oleat und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese zur Bildung einer Protein-Vorfraktion kommt.

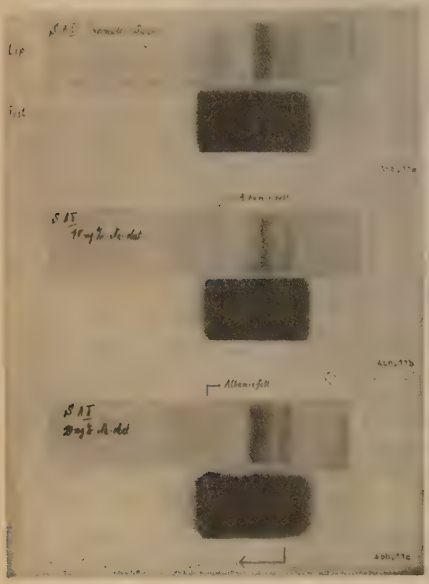
Diese Fraktion ist zwar schon bei Konzentrationen von 50 mg % zu beobachten, erreicht aber eine sehr viel stärkere Ausprägung ab der Konzentration von 100 mg %.
Auffällig ist, daß zugleich mit dem Auftreten dieser stark ausgeprägten Protein-Vorfraktion die α_1-Globuline fast völlig aus dem Elektropherogramm verschwinden.

Während die Protein-Vorfraktion bei Anstieg der Konzentration von Na-oleat immer stärker wird, sinkt die Wanderungsstrecke der Albuminfraktion stark ab. Es wandern dadurch Proteine in einem derartigen Ausmaß vor der Albuminfraktion, daß das ganze Proteinelektropherogramm eine geradezu groteske Umwandlung erfährt (s. Abb. 10). Auffällig ist dabei, daß das Proteinelektropherogramm sich sowohl anoden- als auch kathodenwärts verbreitert, d. h. Proteingruppen einerseits stärker zur Kathode andererseits auch stärker zur Anode wandern.

Vers. 15;

Im Versuch 15 untersuchten wir das mit ansteigenden Konzentrationen Na-oleat versehene Serum A II unter den Bedingungen der abgewandelten Lipoproteidelektrophorese. Nach Abschluß der Elektrophorese wur-

den die Elektrophoresestreifen längs geteilt und je zur Hälfte der Protein- und Lipoproteidfärbung unterzogen. Eine Auswahl dieser Elektrophoresestreifen ist in Abb. 11 dargestellt.



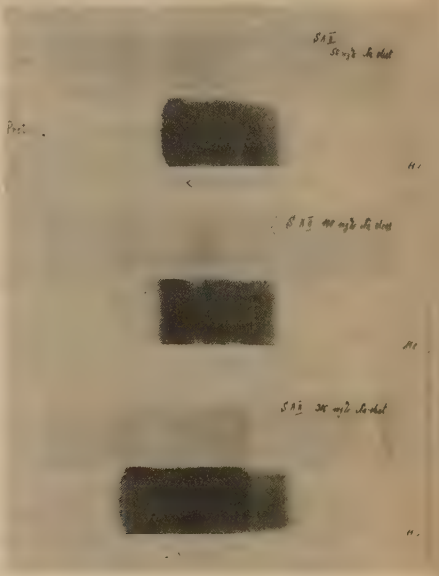


Abb. 11: Serum A II mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Na-oleat. Abgewandelte Lipoproteidelektrophorese. (Die Elektrophoresestreifen wurden längs geteilt und jeweils zur Hälfte der Eiweiß- und Lipoproteidfärbung unterzogen.)

Aus den Abbildungen ist folgendes zu entnehmen:

Unter dem Einfluß von Na-oleat im Serum kommt es auch bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese zur Bildung einer Lipoproteid-Vorfraktion im Elektropherogramm.

Das Auftreten dieser Lipoproteid-Vorfraktion ist verbunden mit dem Verschwinden der α-Lipoproteidfraktion, so daß im Hinblick auch auf das Verhalten der α-Lipoproteidfraktion im Versuch 12 die Lipoproteid-Vorfraktion als vor die Albumine verlagerte α-Lipoproteidfraktion angesehen werden muß.

Von besonderem Interesse ist jedoch, daß der Lipoproteid-Vorfraktion im Elektropherogramm in genau entsprechender Lokalisation bei Eiweißanfärbung immer eine Proteinvorfraktion entspricht, die bei geringen Konzentrationen von Na-oleat im Serum wenig ausgeprägt bei höheren Konzentrationen einen sehr großen Stärkezuwachs aufweist, während die Lipoproteid-Vorfraktion sich in ihrer Stärke nicht verändert.

Wir möchten annehmen, daß es sich bei den sofort mit dem Auftreten der Lipoproteid-Vorfraktion vor den Albuminen schwach anfärbbaren Proteinen um den Proteidanteil dieser Lipoproteide handelt. Er entspricht auch in seiner genauen lokalen Umgrenzung bei Konzentrationen bis 100 mg % Na-oleat im Serum in der Regel so scharf der auftretenden Lipoproteid-Vorfraktion, daß ein Zusammenhang mit ihr als sehr wahrscheinlich angesehen werden muß. Die bei höheren Konzentrationen auftretende Protein-Vorfraktion, deutlich ausgeprägt erst von 20 mg % Na-oleat an, welche schließlich bei 300 mg % Na-oleat eine Stärke von 37 % der Gesamteiweißmenge erreicht, muß dagegen dann außer dem Proteidanteil der Lipoproteid-Vorfraktion auch andere unter dem Einfluß von Na-oleat schneller wandernde Proteingruppen der übrigen Eiweißfraktionen umfassen.

Eine besondere Bereitschaft unter dem Einfluß von hohen Konzentrationen Na-oleat im Serum ihre Wanderungsgeschwindigkeit zu erhöhen muß auf Grund des Versuches 14 von den α_1-Globulinen angenommen werden.

Ergebnisse der Untersuchungen mit Na-oleat

1) Unter der Einwirkung von Na-oleat im Serum kommt es zu einer starken Beschleunigung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit beider Lipoproteidfraktionen.

2) Auf Grund dieser Beschleunigung wird die α-Lipoproteidfraktion im Elektropherogramm vor die Albuminfraktion verlagert, wodurch es zum Auftreten einer Lipoproteid-Vorfraktion kommt.

3) Nach Zusatz von Na-oleat in einer Konzentration von 100 mg % zum Serum ist im Eiweißelektropherogramm auch eine vor der Albuminfraktion gelegene schwach anfärbbare Protein-Vorfraktion nachzuweisen.

4) Der Lipoproteid-Vorfraktion entspricht bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese bis zur Konzentration von 100 mg % nach Eiweißanfärbung der Elektrophoresestreifen die Protein-Vorfrak-

tion in genauer lokalisatorischer Zuordnung.
Es wird angenommen, daß es sich bei dieser Protein-Vorfraktion um den Proteidanteil der Lipoproteid-Vorfraktion handelt.

5) Bei höheren Konzentrationen (über 100 mg %) von Na-oleat im Serum und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese tritt eine völlige Umgestaltung des Eiweißelektropherogramms auf, wobei die Protein-Vorfraktion durch in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit beschleunigte Anteile auch der übrigen Proteinfraktionen schließlich eine Stärke von 37 % des Gesamteiweißgehaltes des Serums erreicht.

Untersuchungen mit Tween 80

Vers. 16;

In einem ersten Versuch unterzogen wir das Serum D 1 nach Zusatz ansteigender Konzentrationen von Tween 80 der normalen Proteinelektrophorese. Bei der quantitativen Auswertung der gewonnenen Elektrophoresediagramme ergab sich, daß

unter dem Einfluß von Tween 80 im Serum bis zur Konzentration von 500 mg % keine quantitativen Änderungen der Eiweißfraktionen im Proteinelektropherogramm auftraten.

Bei der Untersuchung der elektrophoretischen Wanderungsstrecken der Proteinfraktionen unter Einfluß ansteigender Konzentrationen Tween 80 im Serum konnten dagegen deutliche Veränderungen beobachtet werden. In der folgenden Tabelle werden die Wanderungsstrecken der einzelnen Fraktionen bei diesem Versuch tabellarisch zusammengefaßt.

Tween 80 Konzentrt. (mg %)	Proteinfraktionen Wanderungsstrecke (cm)				
	Albuminfr.	α_1-	α_2-	ß-	γ-Glob.fr.
normales Ser.	4,9	3,9	2,8	1,7	1,2 cm
5	5,1	4,0	3,0	1,8	1,1 cm
10	5,1	4,0	3,0	1,8	1,1 cm
20	5,2	4,0	3,0	1,7	1,2 cm
50	5,3	4,2	3,1	1,9	1,2 cm
100	5,3	4,2	3,1	1,9	1,2 cm
300	5,4	4,3	3,2	1,8	1,1 cm
500	5,5	4,4	3,3	2,0	1,3 cm

Tabelle 10: Wanderungsstrecken der Proteinfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Tween 80.
Normale Proteinelektrophorese.

Ergebnis der Untersuchungen:

Nach Zusatz von Tween 80 zum Serum kommt es zu einem parallel der Konzentrationszunahme verlaufenden stetigen Anstieg der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit aller Proteinfraktionen. Schwankungen beim Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit zeigt nur die ß-Globulinfraktion.

Vers. 17;

Anschließend untersuchten wir das gleiche Serum D 1 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Tween 80 auch unter den Bedingungen der normalen Lipoproteidelektrophorese.

Die hierbei gewonnenen Elektrophoresestreifen sind in Abb. 12 aufgeführt.

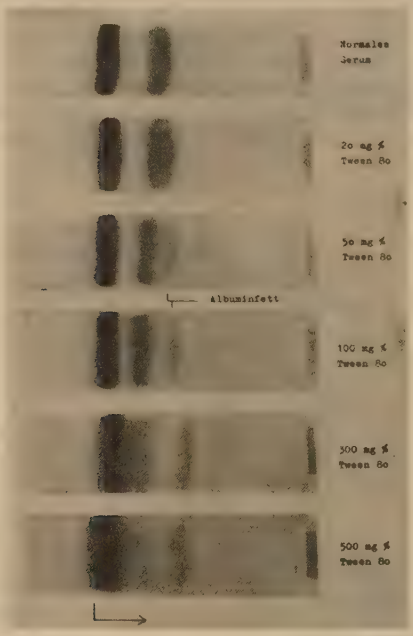


Abb. 12: Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Aus den Abbildungen ist deutlich
eine starke Wanderungsverlangsamung der α-Lipoproteide unter Einfluß ansteigender Tween 80 Konzentrationen im Serum zu erkennen.

Dieser Vorgang führt schließlich dazu, daß bei der Konzentration von 500 mg % Tween 80 im Serum die Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteidfraktion gleich der der ß-Lipoproteidfraktion wird und beide Fraktionen gemeinsam im Elektropherogramm wandern. Eine genaue Auswertung der Wanderungsstrecken beider Lipoproteidfraktionen nach Abschluß der Elektrophorese und Angaben über ihr quantitatives Verhalten in Abhängigkeit der ansteigenden Tween 80-Konzentrationen im Serum ist in der folgenden Tabelle angegeben.

Tween 80 Konzentration mg%	Lipoproteidfraktionen			
	Wanderungsstrecke cm		Relat. %	
	α-Lipopr.	β-Lipopr.	α-Lipopr.	β-Lipopr.
normales Serum	2,4	0,7	18	82
5	2,5	0,7	18,4	81,6
10	2,6	0,8		
20	2,4	0,7	18	82
50	2,1	0,6	20,7	79,3
100	1,8	0,6	22,7	77,3
300	(1,6)?	0,6	12,2 ?	87,8
500		0,5	2,0	98,0

Tabelle 11: Elektrophoretische Wanderungsstrecke und Fraktionsstärke der Lipoproteidfraktionen des Serums D 1 nach Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80 zum Serum.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Bei der Betrachtung der Wanderungsstrecken ist außer der oben schon festgestellten starken Wanderungsverlangsamung der α-Lipoproteide ein Anstieg der Wanderungsstrecke beider Lipoproteidfraktionen bis zur Konzentration von 10 mg% Tween im Serum auffällig. Damit entsprechen die Lipoproteidfraktionen in ihrem Verhalten bis zu dieser Konzentration dem der Proteinfraktionen.

Bei Konzentrationen über 10 mg% Tween im Serum ist das Verhalten der Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen jedoch entgegengesetzt. Einerseits kann eine gleichbleibende Beschleunigung der Proteinfraktionen während der Elektrophorese beobachtet werden (s. Tabelle 10), andererseits kommt es gleichzeitig zu einer Verlangsamung der Lipoproteidfraktionen mit auffällig starker Betonung der α-Lipoproteide.

Die Lipoproteide zeigen entsprechend den Änderungen ihrer Wanderungsgeschwindigkeit auch Änderungen der relativen Stärke ihrer Fraktionen (siehe Tabelle). Die Stärke der α-Lipoproteidfraktion steigt zunächst bis zur Konzentration von 100 mg% an und sinkt danach erheb-

lich ab, um schließlich bei der Konzentration von 500 mg% Tween fast vollkommen zu verschwinden. Eine wichtige Feststellung ist hierbei, daß bis zur Konzentration von 500 mg% keine Lipoproteide am Auftragsstrich liegen geblieben und dort anfärbbar sind (s. Abb. 12).
Die geringe Fraktionsstärke der α-Lipoproteide bei der Konzentration von 300 mg% ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß größere Teile der Fraktion schon bei dieser Konzentration so verändert sind, daß sie mit den β-Lipoproteiden wandern, während die Ursache für die anfängliche Zunahme der α-Lipoproteide bis zur Konzentration von 100 mg% wohl darin besteht, daß auf Grund ihrer kürzeren Wanderungsstrecke bei der Tween-Konzentration von 50- bzw. 100 mg% weniger Teile der Fraktion durch Adsorption an das Elektrophoresepapier verloren gehen.

Zur weiteren Klärung der Befunde im Verhalten der Lipoproteide unter der Wirkung höherer Konzentrationen von Tween 80 unternahmen wir auch Versuche mit dem abgewandelten Elektrophoreseverfahren.

Versuch 18;

Wir unterzogen in diesem Versuch das Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80 der abgewandelten Lipoproteidelektrophorese. Als Ergebnis der Untersuchung konnte lediglich festgestellt werden, daß es
nach Anwendung des abgewandelten Lipoproteidelektrophoreseverfahrens schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen von Tween 80 zu der starken Beeinträchtigung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide kommt als bei Anwendung der normalen Lipoproteidelektrophorese.

So bildeten α- und β-Lipoproteide bei diesem Versuch schon unter der Konzentration von 50 mg% Tween eine gemeinsame Fraktion im Elektropherogramm, während dies beim normalen Lipoproteidelektrophoreseverfahren erst bei Konzentrationen von 300-500 mg% Tween 80 im Serum der Fall war.

Versuch 19;

Im folgenden Versuch untersuchten wir das Serum D 2 mit Zusatz von Tween 80 unter den Bedingungen der abgewandelten Proteinelektrophorese. Die in diesem Versuch gewonnenen Elektrophoresediagramme wurden zur besseren Darstellung der Globulinfraktionen und Globulinteilfraktionen der Langzeitfärbung unterzogen. Diese Elektrophoresestreifen sind in Abb. 13 dargestellt.

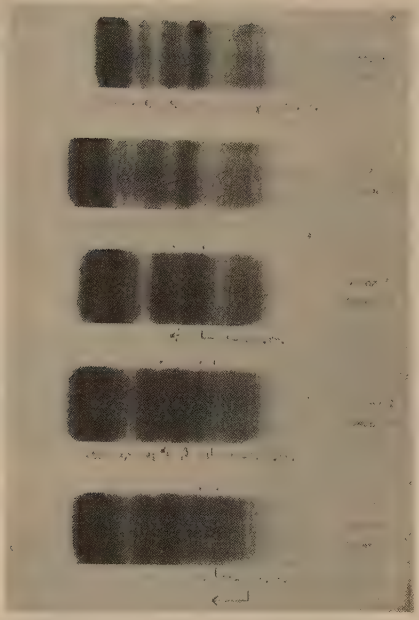


Abb. 13: Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.

Folgende Beobachtungen können anhand der abgebildeten Elektropherogramme gemacht werden:

1. Unter dem Einfluß von ansteigenden Konzentrationen von Tween 80 im Serum und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese ist im Proteinelektropherogramm von einer Konzentration von 100 mg% an aufwärts die α_1-Globulinfraktion nicht mehr sicher nachweisbar.

2. Bei der Konzentration von 50 bzw. 100 mg% Tween 80 sind dagegen mehrere neuauftretende Fraktionen festzustellen
   eine zwischen α2- und ß-Globulinen gelegene α 2'-Globulinfraktion
   zwei zwischen β-Globulinfraktion und Serumauftragsstrich gelegene ß'- und ß''-Globulinfraktionen.

Es sei schon an dieser Stelle darauf verwiesen, daß bei Wiederholung des Versuches mit anderen Seren nicht immer eine derart klare Abgrenzung und deutliche Ausprägung der α_2'- und ß''-Globulinfraktionen wie in den angeführten Proteinelektropherogrammen zu erreichen war.

Regelmäßig nachzuweisen ist bei dieser Versuchsanordnung die ß' - Globulinfraktion, die ß''-Globulinfraktion in der Mehrzahl der Fälle, jedenfalls dann, wenn man zur Anfärbung der Eiweißelektrophoresestreifen die Langzeitfärbung benutzt. Relativ unregelmäßig ist das Erscheinen der α_2'-Globulinfraktion. Welche Faktoren für ihr Auftreten ausschlaggebend sind, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Es erleichtert den Fortgang der Untersuchungsbesprechung, wenn an dieser Stelle ein Versuch angeführt wird, den wir an sich erst später unternahmen, der aber zu dieser Untersuchungsreihe gehört.

Versuch 20;

Das Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Tween 80 wurde unter den Bedingungen der abgewandelten Proteinelektrophorese untersucht. Auf den dabei gewonnenen Elektrophoresestreifen färbten wir jedoch die Lipoproteidfraktionen nach der üblichen Lipoproteidfärbung an. Diese Elektrophoresestreifen sind in Abb. 14 dargestellt.

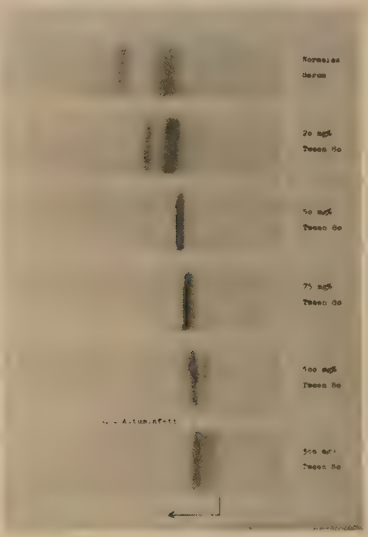


Abb. 14: Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.
Lipoproteidanfärbung.

Aus der Abbildung ist folgendes zu erkennen:

Unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Tween 80 und bei Anwendung der abgewandelten Proteinelektrophorese ist die schon vom Versuch 18 bekannte starke Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteidfraktionen mit besonderer Betonung der α-Lipoproteide festzustellen.

Bei dieser Versuchsanordnung kommt es jedoch zu einer Aufspaltung der unter der Konzentration von 50 mg% Tween von beiden Lipoproteidfraktionen gebildeten gemeinsamen Fraktion bei höheren Tween-Konzentrationen. Es tritt eine schwächere, kathodisch gelegene und eine stärkere, anodisch gelegene Lipoproteidfraktion auf.

Wir möchten annehmen, daß die α-Lipoproteidfraktion unter der Einwirkung ansteigender Konzentrationen von Tween 80 weiter in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit verlangsamt wurde und jetzt hinter der ß-Lipoproteiden wandert, daß es hier also zu einem Stellungstausch beider Lipoproteidfraktionen im Elektropherogramm gekommen ist. Es wäre dann die schwächere, kathodisch gelegene Fraktion identisch mit der α-Lipoproteidfraktion die stärkere, anodisch gelegene mit der ß-Lipoproteidfraktion. Gestützt wird unsere Annahme durch die Entwicklung im Elektropherogrammbild der Lipoproteide unter der Wirkung ansteigender Tween 80-Konzentrationen mit der wesentlich größeren Verlangsamung der α-Lipoproteide gegenüber der der ß-Lipoproteide. Weiterhin fällt auf, daß sich auch das quantitative Verhältnis der Fraktionen zueinander umgekehrt hat bzw. - wenn wir annehmen, daß die Fraktionen ihre Lage im Elektropherogramm getauscht haben - ungefähr gleich geblieben ist. Die im Elutionsverfahren vorgenommene Messung der Stärke beider Lipoproteidfraktionen, deren Ergebnis in der folgenden Tabelle 12 angeführt wird, verdeutlicht dies.

Tween 80 Konzentration	Lipoproteidfraktionen Fraktionsstärke Rel. %	
mg%	α-Lipopr.	ß-Lipopr.
normal. Serum	18	82
10	23	77
20	23	77
50	100	
100	61	39
200	70,5	29,5

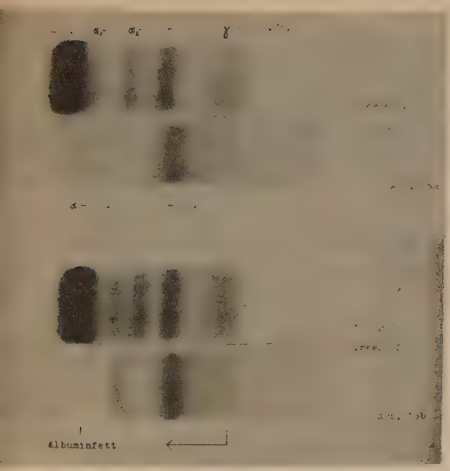
Tabelle 12: Stärke der Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Tween 80.
Abgewandelte Lipoproteidelektrophorese.

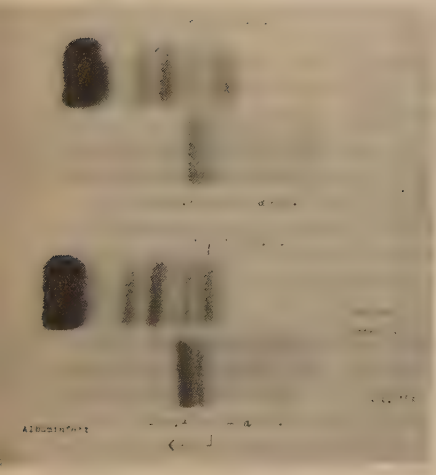
Daß die - wie wir annehmen - dem Auftragsstrich des Serums jetzt näher gelegene α-Lipoproteidfraktion bei der Konzentration von 100 mg% eine Zunahme ihrer Stärke um 16 % zeigt, mag daran liegen, daß sie auch einige Anteile der ß-Lipoproteidfraktion enthält, die sie bei ihrer Wanderung aufgehalten hat; außerdem fallen jetzt auch Anteile der sogenannten "Schleppe" in ihren Bereich. Bei höheren Konzentrationen von Tween 80 tritt dann wieder ein ursprünglicheres Verhältnis beider Fraktionen in Erscheinung.

Nachdem unter der Wirkung verschiedener Tween 80-Konzentrationen sowohl im Protein- wie im Lipoproteidelektropherogramm erhebliche Veränderungen beobachtet werden konnten, lag die Frage nahe, ob diese nicht in irgendeiner Weise untereinander in Beziehung stünden. Zur Klärung dieser Frage unternahmen wir den folgenden Versuch.

Versuch 21;

Wir unterzogen das Serum D 2 nach Zusatz ansteigender Konzentrationen von Tween 80 der abgewandelten Proteinelektrophorese. Nach Abschluß des Elektrophoreseverfahrens wurden die Elektrophoresestreifen längs geteilt und jeweils eine Hälfte der normalen Eiweißfärbung die andere der Lipoproteidfärbung unterworfen. Die so gewonnene Elektrophoresestreifen sind in Abb. 15 dargestellt.





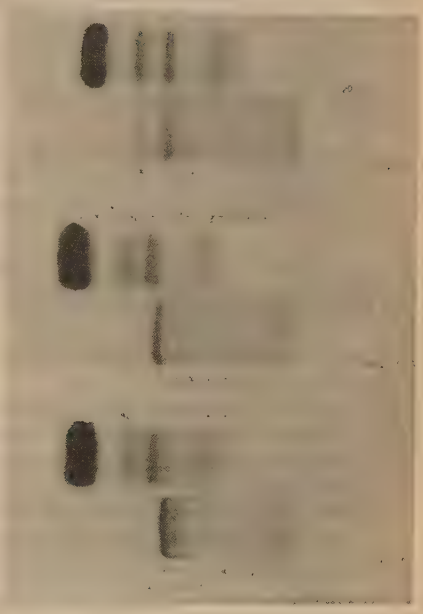


Abb. 15: Serum D 2 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Tween 80. Abgewandelte Proteinelektrophorese. Die Elektrophoresestreifen wurden längs geteilt und eine Hälfte der Eiweiß- die andere der Lipoproteidfärbung unterzogen.

Aus der Abbildung 15 geht folgendes hervor:

Unter dem Einfluß der dem Serum zugefügten Konzentrationen von Tween 80 und bei Benutzung der abgewandelten Proteinelektrophorese kommt es wieder wie in Abb. 13 zum Auftreten der α_2'-, ß'-, und in angedeuteter Form der ß''-Globulinfraktion.
Auch ist von der Konzentration von 50 mg% Tween 80 an die α_1-Globulinfraktion im Proteinelektropherogramm nicht mehr nachweisbar.

Die schlechte Ausprägung der ß''-Globulinfraktion hängt wie oben erwähnt von der Wahl der Eiweißfärbemethode ab. Wir zogen aber für diesen Versuch die übliche Kurzzeitfärbung der Proteinelektrophoresestreifen vor, um möglichst normale, auch für eine quantitative Auswertung des Proteinelektropherogramms geeignete Verhältnisse zu schaffen und nahmen dafür die schlechte Anfärbung der ß''-Globulinfraktion in Kauf.

Außerdem ist bei diesem Versuch auch wieder
die starke Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit beider Lipoproteidfraktionen insbesondere der α-Lipoproteide festzustellen.

Sie führt bei der Konzentration von 50 mg% Tween 80 zur Bildung einer gemeinsamen Fraktion und zu deren erneuter Spaltung bei höheren Konzentrationen Tween 80.

Besonders interessant gerade im Hinblick auf die Fragestellung dieses Versuches ist jedoch,
daß der von beiden Lipoproteidfraktionen gebildeten gemeinsamen Fraktion bzw. bei höheren Tween 80-Konzentrationen der stärkeren von beiden Lipoproteidfraktionen sobald sie bei der Konzentration von 50 mg% Tween 80 kathodenwärts der ß-Globulinfraktion wandert im Eiweißelektropherogramm in genauer lokalisatorischer Zuordnung immer eine Proteinbande entspricht, die von uns als ß'-Globulinfraktion bezeichnet wurde.

Die stärkere der beiden Lipoproteidfraktionen nach Spaltung der gemeinsamen Fraktion bei 75 mg% Tween halten wir aus den oben angegebenen Gründen für die ß-Lipoproteidfraktion.

Es sei darauf hingewiesen, daß wir bei den Versuchen mit Natriumdesoxycholicum schon einmal eine die ß-Lipoproteide begleitende Proteinfraktion beobachten konnten. Sie machte sich damals jedoch nicht optisch im Elektropherogramm bemerkbar wie bei diesen Versuchen, sondern ihr Einfluß mußte aus dem Anstieg der Fraktionsstärke der jeweils von den ß-Lipoproteiden überlagerten Eiweißfraktionen geschlossen werden (s. Tab. 5).

Wie bei den Versuchen mit Natriumdesoxycholicum müssen wir auch anhand der Befunde dieser Untersuchungen aus der Tatsache, daß beide Fraktionen
Lipoproteid- und Proteinfraktion immer gleichzeitig und in ihrer Lokalisation auf dem Elektrophoresestreifen immer genau einander zugeordnet auftreten, annehmen, daß es sich bei der die ß-Lipoproteide begleitenden ß'-Globulinfraktion um den Proteidanteil der ß-

Lipoproteide handelt,
der bei der üblichen elektrophoretischen Darstellung von der ß-Globulinfraktion überdeckt und in ihr erfaßt wird. Die Annahme, daß die ß'-Globulinfraktion nur eine Teilfraktion der ß-Globulinfraktion ist, konnte durch die quantitative Auswertung der Proteinelektrodiagramme des Versuches 21 wahrscheinlich gemacht werden. Eine Übersicht über die Fraktionsstärke der einzelnen Proteinfraktionen in Abhängigkeit von der Tween 80-Konzentration ist in der folgenden Tabelle gegeben. In ihr wurde die Lage der Lipoproteidfraktionen im Elektropherogramm in Beziehung zur Lage der Proteinfraktionen wie in der Tabelle 5 durch verschiedene Markierungen gekennzeichnet.

Tween 80	Proteinfraktionen Fraktionsstärke Rel.%								Lipoprot.fr. Frakt.st.Rel%	
Konzentrt. mg %	Alb. fr.	α_1-	α_2-	α'_2-	ß-	ß'-	ß''-	γ_0-Glob. fr.	α-Lip. fr.	ß-Lip. fr.
Norm.Ser.	67,3	2,0	7,7		9,6			13,4	2o,o	8o,o
5	67,o	5,3	7,6		8,8			11,3		
1o	64,o	4,1	8,o		1o,o			13,9	21,o	79,o
2o	65,o	2,8	9,1		9,3			13,6	23,o	77,o
5o	66,6	1,8	4,6	4,2	7,5	1,5		13,8	1oo	
75	71,3		5,6	3,4	5,6	2,8		11,3	63,o	37,o
1oo	68,3		6,9		9,9	3,o		12,9	68,o	32,o
3oo	67,3		6,8		1o,2	3,2	1,2	11,3	64,o	36,o

Tabelle 13: Stärke der Protein- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen von Tween 80.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.

= Marke für die α-Lipoproteidfraktion

= Marke für die ß-Lipoproteidfraktion

Aus der Tabelle geht hervor,
daß es sich bei der die ß-Lipoproteide begleitenden ß'-Globulinfraktion um eine Teilfraktion der ß-Globuline und nicht um eine aus Bestandteilen des übrigen Elektropherogramms sich zusammensetzende neue Fraktion handelt.

Die Stärke der beiden Teilfraktionen der ß- und ß'-Globulinfraktion ergibt zusammen bei ungefähr gleichbleibender Stärke aller übrigen Fraktionen, die ursprüngliche Stärke der ß-Globulinfraktion. Die Angabe über die ß'-Globulinfraktionsstärke von 1,5 und 2,8 Rel. % ist jedoch als absoluter Wert nur mit Einschränkungen zu verwerten, da einmal dieser Teil nicht scharf von der übrigen ß-Globulinfraktion abzutrennen ist, das andere Mal in den Bereich der γ-Globuline fällt und bei der quantitativen Bestimmung Teile dieser Fraktion zwangsläufig miterfaßt werden.

Außerdem ist als weitere wichtige Beobachtung aus der Tabelle abzulesen,

daß es sich zu einem deutlichen Anstieg der von den α-Lipoproteiden jeweils überlagerten Proteinfraktion kommt.

Es ist dies ein Vorgang, der auch schon bei bloßer Betrachtung der betreffenden Elektrophoresestreifen festzustellen ist (s. Abb. 15). Die starke Erhöhung der α_1-Globulinfraktion bei der Tween-Konzentration von 5 und 10 mg% findet ihre Ursache jedoch wahrscheinlich nicht nur in der Überlagerung durch die α-Lipoproteide, sondern auch in der besseren Abgrenzung der α_1-Globulinfraktion bei diesen Konzentrationen gegen die Albuminfraktion und ihrer dadurch möglichen besseren quantitativen Erfassung. Daß jedoch nur ein Teil des Anstiegs darauf zurückzuführen ist, geht daraus hervor, daß nach Verlagerung der α-Lipoproteide in den Bereich der α_2-Globuline der Stärkezuwachs sich sofort von den α_1-Globulinen zur $_2$-Globulinfraktion verlagert und lediglich eine Erhöhung der α_1-Globulinfraktion um 0,8 % bestehen bleibt.

Als Einzelfraktion kann der Proteidanteil der α-Lipoproteide häufig bei höheren Konzentrationen Tween 80 unter Anwendung der abgewandelten Elektrophorese sichtbar gemacht werden, wenn beide Lipoproteidfraktionen ihre Stellung vertauscht haben. Der Proteidanteil der α-Lipoproteide wird dann neben dem der ß-Lipoproteide als gesonderte Fraktion zwischen ß- und γ-Globulinen sichtbar. Wir bezeichneten ihn dann wie in der Abb. 13 als ß''-Globulinfraktion. Zu einer deutlichen Anfärbung ist jedoch die Langzeitfärbung mit ihrer stärkeren Anfärbung der Globuline notwendig, wie wir sie für die Anfärbung der in Abb. 13 angeführten Elektrophoresestreifen benutzten.

Ergebnisse der Untersuchungen mit Tween 80

1) Unter dem Einfluß von Tween 80 im Serum kommt es parallel zum Konzentrationsanstieg dieser Substanz zu einer starken Verlangsamung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit beider Lipoproteidfraktionen.

2) Diese elektrophoretische Wanderungsverlangsamung betrifft insbesondere die α-Lipoproteidfraktion, so daß sie unter dem Einfluß von 50 mg % Tween 80 und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese mit den ß-Lipoproteiden gemeinsam in einer Fraktion und bei höheren Konzentrationen Tween 80 schließlich langsamer als die ß-Lipoproteide wandert.

3) Gegenüber der Verlangsamung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß höherer Konzentrationen Tween 80 wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteinfraktionen parallel dem Konzentrationsanstieg von Tween 80 erhöht.

4) Eine der Lokalisation der ß-Lipoproteidfraktion im Eiweißelektropherogramm entsprechende ß'-Globulinfraktion kann nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß es sich bei dieser Proteinfraktion um den Proteidanteil der ß-Lipoproteide handelt.

5) Bei der durch die verlangsamte Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide bedingten kathodischen Verlagerung dieser Fraktion ist ein Anstieg in der Fraktionsstärke der jeweils im Elektropherogramm von den α-Lipoproteiden überlagerten Proteinfraktion festzustellen. Dieser Proteidanteil der α-Lipoproteide kann bei entsprechender Anfärbung als Einzelfraktion (ß''-Globulinfraktion) sichtbar gemacht werden.

6) Unabhängig von den Veränderungen im Lipoproteidelektropherogramm kommt es bei der Konzentration von 50 mg % Tween 80 und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese gelegentlich auch zum Auftreten einer von den α_2-Globulinen abgespaltenen α_2'-Globulinfraktion.

7) Bei Konzentrationen über 100 mg % Tween 80 im Serum und bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese ist die α_1-Globulinfraktion im Proteinelektropherogramm nicht mehr sicher nachweisbar.

Untersuchungen mit Zephirol

Versuch 22;

Das Serum D 3 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen von Zephirol wurde unter den Bedingungen der normalen Lipoproteidelektrophorese untersucht. Die Elektrophoresestreifen mit den deutlichsten Veränderungen sind in Abb. 16 dargestellt.

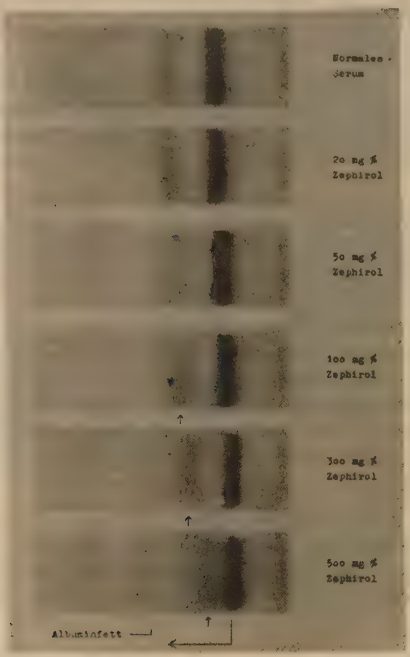


Abb. 16: Serum D 630 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Zephirol.
Normale Lipoproteidelektrophorese.

Aus den angeführten Elektrophoresestreifen ist zu ersehen, daß es unter der Wirkung ansteigender Konzentrationen von Zephirol im Serum zu einer zunehmenden elektrophoretischen Wanderungsverlangsamung beider Lipoproteidfraktionen kommt, die insbesondere im Verhalten der α-Lipoproteide zum Ausdruck kommt.

Versuch 23;

Die Untersuchung des mit ansteigenden Konzentrationen Zephirol versehenen Serums unter den Bedingungen der normalen Proteinelektrophorese erbrachte bei der üblichen Kurzzeitanfärbung der Elektrophoresestreifen keinen auffälligen Befund. Nach Anwendung der Langzeitfärbung konnten in drei von acht Versuchen gleichartige Änderungen im Proteinspektrum sichtbar gemacht werden. Zwei Reihen der in diesen Versuchen gewonnenen Elektrophoresestreifen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

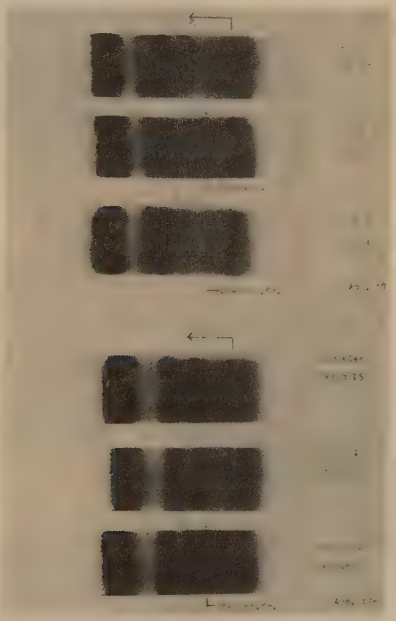


Abb. 17: Serum D 4 und D 5 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Zephirol.
Normale Proteinelektrophorese.

Ergebnis des Versuchs 23:

Bei der Konzentration von 50 und 100 mg % Zephirol im Serum kommt es im Eiweißelektrophoresediagramm gelegentlich zum Auftreten einer neuen Proteinfraktion im Bereich zwischen ß- und γ-Globulinen.

Diese unregelmäßig auftretende neue Proteinfraktion wurde von uns als ß'-Globulinfraktion bezeichnet. Einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Fraktion und der kathodischen Verlagerung der α-Lipoproteide bei höheren Zephirol-Konzentrationen konnten wir nicht feststellen. Schon die Konzentration des Zephirols ist für beide Vorgänge

so verschieden, daß ein Zusammenhang zwischen ihnen unwahrscheinlich ist.

Die elektrophoretische Wanderungsstrecke der Lipoproteid- und Proteinfraktionen in Abhängigkeit ansteigender Zephirolkonzentrationen unter den Bedingungen der normalen Lipoproteid- und Proteinelektrophorese ist in der folgenden Tabelle angegeben.

Zephirol-konzentration (mg%)	Proteinfraktionen Änderungsstrecke (cm)						Lipoproteidfr. Wanderungsstrecke (cm)	
Co (mg%)	Alb.	α_1-	α_2-	ß-	ß'-	γ-Glob. fr.	α-Lip.	ß-Lip.
norm.	4,8	3,8	2,6	1,7		-1,3	2,5	0,5
5	4,9	3,8	2,7	1,7		-1,4	2,5	0,6
10	5,1	3,9	2,7	1,7		-1,3	2,6	0,6
20	5,2	3,9	2,8	1,8		-1,2	2,5	0,6
50	5,2	3,9	2,7	1,7	1,2	-1,4	2,5	0,6
100	5,2	4	2,8	1,8	0,9	-1,2	2,3	0,4
300	5,3	4,1	2,9	1,8		-1,4	1,6	-0,1
500	5,5	4,3	3	2		-1,2	0,9	-0,2

Tabelle 14: Wanderungsstrecke der Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen von Zephirol. Normale Protein- und Lipoproteidelektrophorese.

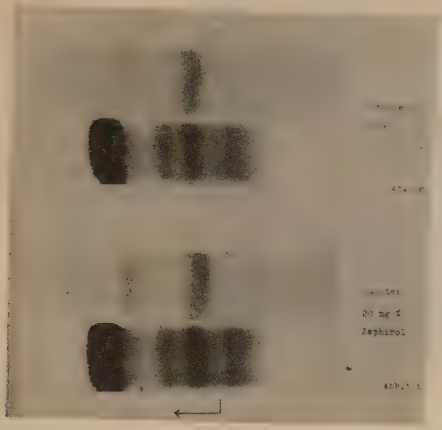
Ergebnis:

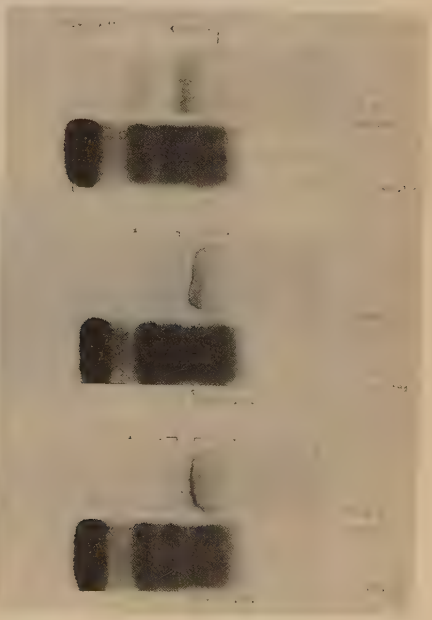
Bei den Proteinen finden wir einen ungefähr linearen Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fraktionen, parallel verlaufend der Konzentrationszunahme des Zephirols. Dagegen findet sich bei den Lipoproteiden nur bis zur Konzentration von 10 mg % eine ansteigende Wanderungsgeschwindigkeit. Bei höheren Zephirolkonzentrationen wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteide stark verlangsamt.

Zur genaueren Untersuchung der Wirkung des Zephirols auf das Eiweiß- und Lipoproteidelektropherogramm unternahmen wir auch Versuche mit dem abgewandelten Elektrophoreseverfahren.

Versuch 24;

In diesem Versuch unterzogen wir das Serum D 3 nach Zusatz ansteigender Konzentrationen von Zephirol der abgewandelten Proteinelektrophorese. Nach der Elektrophorese wurden die Papierstreifen längs geteilt und jeweils eine Hälfte der Protein- die andere der Lipoproteidfärbung unterzogen. Die wichtigsten Elektrophoresestreifen sind in Abb. 18 abgebildet.





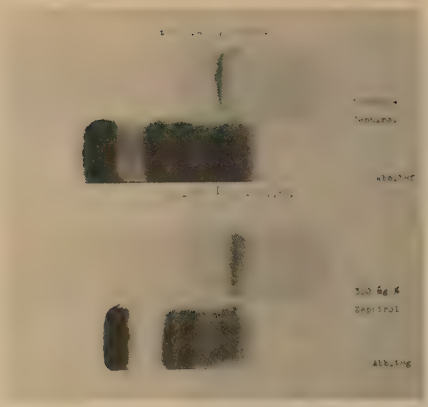


Abb. 18: Serum D 3 mit Zusatz ansteigender Konzentrationen Zephirol.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.
Die Elektrophoresestreifen wurden längs geteilt und die eine Hälfte der Eiweiß- die andere der Lipoproteidfärbung unterzogen.

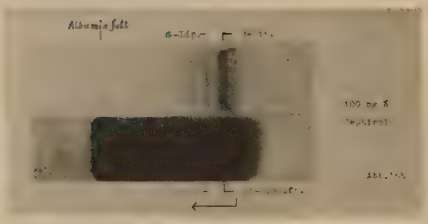


Abb. 18: Serum D 4 mit Zusatz von 100 mg % Zephirol.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.
Verlängerte Färbezeit.

Aus der Abbildung 18 ist zu ersehen, daß

unter dem Einfluß ansteigender Zephirolkonzentrationen und bei Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens die elektrophoretische Wanderungsstrecke sowohl der α - wie der ß-Lipoproteidfraktion abnimmt.

Bei der Konzentration von 300 mg % Zephirol ist die Wanderungsstrekke beider Lipoproteidfraktionen gleich 0, d. h. beide Lipoproteidfraktionen sind am Auftraggstrich des Serums liegen geblieben. Bei Betrachtung der Proteinelektropherogramme zeigt sich,

daß auch durch Zephirol-Konzentrationen im Serum (von 70 - 100 mg %) bei Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens in genauer lokalisatorischer Zuordnung zu den in ihrer Lage im Elektropherogramm stark verschobenen Lipoproteidfraktionen das Auftreten neuer Eiweißfraktionen im Proteinelektropherogramm hervorgerufen wird.

Diese neu auftretenden Proteinfraktionen wurden in Anlehnung an unser Vorgehen bei den Versuchen mit Tween 80 auch hier als ß'- und ß"-Globulinfraktion bezeichnet, weil wir annehmen, daß es sich bei der immer an der Stelle im Eiweißelektropherogramm, an der bei Lipoproteidfärbung die ß-Lipoproteide nachweisbar sind, auftretenden ß'-Globulinfraktion um den Proteidanteil der ß-Lipoproteide handelt. Entsprechend halten wir auch die bei der Konzentration im Eiweißelektropherogramm auftretende ß"-Globulinfraktion für den Proteidanteil der α-Lipoproteidfraktion. Diese ß"-Globulinfraktion ist in der Abb. 18 nur einmal und zwar bei der Konzentration von 100 mg % Zephirol angedeutet sichtbar. Wir haben daher außerdem noch die Abbildung beider Hälften eines Elektrophoresestreifens aus einem unter denselben Bedingungen abgelaufenen Versuchs in Abb. 18 h angeführt, bei dem die ß'Globulinfraktion durch eine 4 Stunden längere Färbezeit auf dem entsprechenden Elektropherogrammstreifen besser zum Ausdruck kommt.

Um die Herkunft der neu auftretenden Proteinfraktionen zu klären, nahmen wir auch die quantitative Auswertung der Elektrophoresestreifen des Versuchs 24 vor. Eine Übersicht über die Stärke der Protein- und Lipoproteidfraktionen in Abhängigkeit verschiedener Zephirolkonzentrationen bei Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens ist in der folgenden Tabelle enthalten. Die unter der Einwirkung der verschiedenen Zephirol-Konzentrationen sich ändernde Lage der Fettfraktionen in Beziehung zu den Proteinfraktionen wurde in der Tabelle durch besondere Markierungen im Bereich der jeweils von den Lipoproteiden überlagerten Proteinfraktion hervorgehoben.

Zephirol	Proteinfraktionen Fraktionsstärke Rel.%							Lipopr.frakt. Fraktionsstärke Rel%	
Konztrt. mg %	Alb. fr.	α_1-	α_2-	ß-	ß''-	ß'-	γ-Glob. fr.	α- Lip. fr.	ß-Lip. fr.
Norm.Ser.	58	4	7	14			17	2o	8o
1o	58	4,5	7	14			16.5	2o	8o
2o	53,8		1o	14			18	22	78
5o	54	2,1		14,2			17,7	25	75
7o	52,2	2,2	11,4	12,4		4	17	24	76
9o	54,5	2,1	11,3	12,		4	15,3	2o	8o
1oo	54	2,o	1o,2	13,3		6	1o,2	18	82
3oo	5o		1o	16,5			23,6		

Tabelle 15: Stärke der Protein- und Lipoproteidfraktionen unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen Zephirol.
Abgewandelte Proteinelektrophorese.

= Markierung für α-Lipoproteide

= Markierung für ß-Lipoproteide.

Eine sichere Aussage über die Herkunft der ß'-Globulinfraktion ist auf Grund der Tabellenwerte nicht zu machen.

Dennoch weist der Abfall der ß-Globulinfraktionsstärke von 14,2 auf 12,4 Rel.% unter der Zephirol-Konzentration von 70 mg% beim Auftreten der ß'-Globulinfraktion darauf hin, daß es sich auch bei der unter Zephiroleinwirkung entstehenden ß'-Globulinfraktion um eine abgesplitterte Teilfraktion der ß-Globuline handelt.

Dabei können wir annehmen, daß der Rückgang der ß-Globulinfraktionsstärke noch deutlicher ausfiele, wenn nicht gleichzeitig bei dieser Zephirolkonzentration die ß-Globulinfraktion von den α-Lipoproteiden überlagert würde, denn es ist nachzuweisen,

daß der bei der Zephirolkonzentration von 100 mg% als Einzelfraktion sichtbar zu machende Proteidanteil der α-Lipoproteide (s. Abb. 18 f und 18 h) bei der unter ansteigenden Zephirolkonzentrationen immer geringeren Wanderungsstrecke dieser Fraktion nicht ohne Einfluß auf die Fraktionsstärke der jeweils überlagerten Proteinfraktion bleibt.

Er zeigt sich insbesondere in dem Abfall der Fraktionsstärke der α_1-Globuline von 4,7 auf 2,1 Rel.% unter gleichzeitigem Anstieg der α_2-Globulinfraktionsstärke von 10 auf 12 Rel.% bei Verlagerung der α-Lipoproteide aus dem Bereich der einen in den der anderen Fraktion.

Die Stärke der beiden die Lipoproteide begleitenden Proteinfraktionen ist in der Tabelle mit maximal 3,6 bzw. 6,7 Rel.% angegeben. Dieser Wert liegt zu hoch und ist dadurch zu erklären, daß hierbei auch Anteile der γ-Globulinfraktion, in deren Bereich beide Banden zu liegen kommen, miterfaßt werden. Gleichzeitig erklärt sich damit auch der Abfall der γ-Globuline.

Die Verhältnisse im Elektropherogramm bei höheren Zephirolkonzentrationen waren so grob verändert, daß sich eine Untersuchung dieser Ergebnisse nicht lohnt, zumal die Lipoproteide dann fast vollständig ausgefallen und am Auftragsstrich des Serums liegen geblieben waren (s. Abb. 18 g).

Ergebnisse der Untersuchungen mit Zephirol

1) Unter der Einwirkung von Zephirol im Serum kommt es zur Verlangsamung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit beider Lipoproteidfraktionen, deren Ausmaß mit zunehmender Zephirolkonzentration ansteigt.

2) Im Gegensatz zum Verhalten der Lipoproteide wird die Wanderungsgeschwindigkeit der meisten Proteinfraktionen mit ansteigender Zephirolkonzentration im Serum beschleunigt.

3) Unter Anwendung des abgewandelten Elektrophoreseverfahrens und bei Zephirolkonzentrationen von 70 - 100 mg% kann nach Verlagerung der ß-Lipoproteidfraktion von ihrer normalen Lage im Bereich der ß-Globuline in den Bezirk zwischen ß- und γ-Globuline im Eiweißelektropherogramm an der Stelle der ß-Lipoproteide eine neu in Erscheinung tretende Proteinfraktion nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß es sich bei dieser Fraktion um den Proteidanteil der ß-Lipoproteide handelt.

4) Ein entsprechender Proteidanteil der α-Lipoproteide ist ebenfalls nach Verlagerung dieser Fraktion in den Bereich zwischen ß- und γ-Globuline dort im Eiweißelektropherogramm als Einzelfraktion anzufärben. Der Proteidanteil der α-Lipoproteide macht sich in angedeuteter Form auch in einem Anstieg der Fraktionsstärke der auf Grund der verlangsamten Wanderungsgeschwindigkeit von ihr jeweils überlagerten Proteinfraktion bemerkbar.

IV. Besprechung der Untersuchungsergebnisse

a) Lipoproteidfraktionen

Bei einer Besprechung der Änderungen im elektrophoretischen Verhalten einzelner Fraktionen unter dem Einfluß der oberflächlichen aktiven Substanzen müssen an erster Stelle die Abweichungen im elektrophoretischen Verhalten der α-Lipoproteide erwähnt werden. Diese Fraktion wird in zwei Richtungen beeinflußt:

1. in der Wanderungsbeschleunigung der α-Lipoproteide und ihrem dadurch bedingten Auftreten im Elektropherogramm als Vorfraktion vor den Albuminen,
   (Gruppe der Gallensäuren und Na-oleat)
2. in der Verlangsamung ihrer Wanderungsgeschwindigkeit durch Tween 80 und Zephirol.

Daß es sich beim Auftreten der Lipoproteid-Vorfraktion tatsächlich nur um eine Verschiebung der α-Lipoproteide vor die Albuminfraktion handelt, ist durch die Entwicklung des Elektropherogrammbildes unter dem Einfluß ansteigender Konzentrationen der zugefügten Substanzen bis zum Auftreten der Vorfraktion und durch das gleichbleibende quantitative Verhältnis der Summe der beiden entstehenden Teilfraktionen der α-Lipoproteide zur ß-Lipoproteidfraktion hinlänglich gezeigt worden.

Unterschiedlich ist jedoch - wie schon einmal erwähnt - die Intensität mit der die einzelnen Gallensäuren und übrigen Substanzen die Lipoproteide beschleunigen. Folgende Tabelle mag dies näher zeigen: (Zum Vergleich der Wirkungsintensität der einzelnen Substanzen wählten wir ihre beschleunigende Wirkung auf die Lipoproteidfraktionen unter der Konzentration von 100 mg% im Serum, angewandt unter den Bedingungen der normalen Lipoproteidelektrophorese.)

Untersuchte Substanz	Co. (mg %)	α-Lipoproteide		ß-Lipoproteide	
		Zunahme an zurückgelegter Str. (cm)	Beschleunigung um (%)	Zunahme an zurückgelegter Str. (cm)	Beschleunigung um (%)
Na-cholat	100	1.2	48	0.25	33
Glykocholsäure	100	0.5	17	0.3	30
Na-desoxycholsäure	100	1.3	28	0.2	10
Na-dehydrocholsäure	100	0.1	3	0.2	27
Na-oleat	100	1.55	45	1.15	96
Tween 80	100	-0.65	-27	-0.1	-14
Zephirol	100	-0.25	-10	-0.1	-20

Tab. 16: Beschleunigende Wirkung der angeführten Substanzen auf die Lipoproteidfraktionen, demonstriert anhand der Wanderungsstreckenzunahme bei Konzentration von 100 mg % der aufgeführten Substanzen im Serum und einfacher Elektrophorese gegenüber der Wanderungsstrecke der Lipoproteidfraktionen ohne Zusatz. (Ein negatives Vorzeichen weist auf eine Abnahme der Wanderungsstrecke bzw. eine Wanderungsverlangsamung hin.)

Aus der Tabelle ist deutlich zu ersehen, daß die beschleunigende Wirkung der Gallensäuren auf die α-Lipoproteide in der Reihenfolge: Na-cholat, Na-desoxycholsäure, Glykocholsäure und - weit zurückliegend - Na-dehydrocholsäure abfällt. Auch Na-oleat besitzt mit 45 % Zunahme der normalen Wanderungsstrecke eine hohe Beschleunigungskraft.

Leider wird aus dieser Übersicht nicht genügend deutlich, in welch typischer Weise Tween 80 die α-Lipoproteide gegenüber den ß-Lipoproteiden beeinflußt. Dies geht am besten aus dem Elektropherogrammbild hervor, das insbesondere bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese gut zeigt, wie unter der Wirkung dieser Substanz die Verlangsamung der α-Lipoproteidfraktion im Gegensatz zu der der ß-Lipoproteide ein derartiges Ausmaß erreicht, (- 71 %) daß sie schließlich in vertauschter Stellung noch hinter den ß-Lipoproteiden wandert (s. Abb. 14 und 15).

Bei der Beeinflussung der ß-Lipoproteide durch die Gallensäuren ergibt sich eine etwas andere Reihenfolge in der Wirkungsintensität, doch steht auch hier die Cholsäure an der Spitze, gefolgt von der Glykocholsäure, Na-dehydrocholicum und Na-desoxycholsäure (Einfluß der Oxy-

dationsstufe der Gallensäuren?).

Der auffällig starke Einfluß der Cholsäure auf die Lipoproteidfraktionen steht in Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen verschiedener anderer Autoren, die ebenfalls eine besondere Wirkung der Cholsäure auf die Lipide des Blutes beschrieben (FRIEDMAN und BYERS (12), RUDMAN und KENDALL (39)).

Bemerkenswert ist auch die besondere Wirkung des Na-oleats auf die ß-Lipoproteide, die unter seiner Einwirkung eine Beschleunigung um fast 100 % zeigen.

Regelmäßig auftretende quantitative Verschiebungen zwischen beiden Lipoproteidfraktionen unter der Wirkung einer der untersuchten Substanzen konnten nicht beobachtet werden.

Das besagt jedoch nur, daß die Gallensäuren und übrigen oberflächenaktiven Substanzen keinen Einfluß auf die quantitativen Verhältnisse haben, wenn sie außerhalb des Körpers mit den Lipoproteiden in Berührung kommen. Eine andere Frage ist die, welche Veränderungen sich böten, wenn wir sie parenteral einem Körper zuführten, wie es z. B. SCHÖLL-SCHETTLER mit Heparin (47) und SCHÖN mit Triton (48) taten, ebenfalls zwei oberflächenaktiven Substanzen. Bald nach Applikation dieser Stoffe konnten die angeführten Autoren auch quantitative Veränderungen im Lipoproteidspektrum beobachten: Nach Heparininjektionen eine Zunahme der α -Lipoproteid- nach Triton der ß-Lipoproteidfraktion. SCHÖLL-SCHETTLER machen hierbei jedoch die Einschränkung, daß diese Verschiebung hauptsächlich bei Seren beobachtet werden konnte, die von vornherein lipämisch waren, während sie sich im normalen Serum nicht beobachten ließ. Sie führen diese Veränderungen auf die Wirkung des Heparins als Klärfaktor im Serum zurück.

b) Proteinfraktionen

Durch das Auftreten einer V o r f r a k t i o n der Eiweiße im Elektropherogramm wird der Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen, in diesem Falle insbesondere des anionischen Na-desoxycholicums und Na-oleats, auch auf das Eiweißelektropherogramm deutlich.

Es mußte jedoch schon gelegentlich der früher besprochenen Versuche mit Na-desoxycholicum festgestellt werden, daß wir uns über die Herkunft der Eiweiße der Eiweiß-Vorfraktion von den übrigen Proteinfraktionen kein klares Bild machen können. Wir wiesen darauf hin, daß das Auftreten dieser Fraktion sicherlich mit dem Auftreten der Vorfraktion der Lipoproteide in Zusammenhang steht bzw., daß die Proteine der Eiweiß-Vorfraktion wenigstens zum Teil sich vom Proteidanteil der vorgewanderten Lipoproteide herleiten. Aber eben nur zum Teil, der andere Teil muß sich aus selbständig vorgewanderten Elementen der Proteinfraktionen des übrigen Eiweißelektropherogramms zusammensetzen. Man kann jedoch wegen der geringen Stärke der Eiweiß-Vorfraktion und der damit verbundenen methodischen Schwierigkeit in der Herleitung von den übrigen, in ihrer Größe ebenfalls schwankenden Proteinfraktionen nicht mit genügender Sicherheit sagen,

von welcher bzw. von welchen Fraktionen dieser Teil stammt. Die quantitativen Auswertungen der entsprechenden Elektrodiagramme weisen darauf hin, daß dafür in erster Linie die Albumin- und α_1-Globulinfraktion in Frage kommt. Das würde auch der Tatsache entsprechen, daß in diesem Elektropherogrammbereich auch der Proteidanteil der α-Lipoproteidfraktion, also der vorgewanderten Lipoproteide, beim normalen Elektrophoreseverfahren zur Darstellung kommen müßte. Eine Bildung der Eiweiß-Vorfraktion unter dem Einfluß von Na-desoxycholicum gerade aus der Albumin- und α_1-Globulinfraktion entspräche auch der besonders starken Bindungsfähigkeit dieser Eiweißgruppen gegenüber Na-desoxycholicum wie sie von RUDMAN und KENDALL experimentell festgestellt wurde (40).

In welcher Zusammensetzung darüber hinaus die Vorfraktion noch abgespaltene Teile auch der anderen Proteinfraktionen enthält, müßten andere genauere Untersuchungen noch klären.

Daß grundsätzlich auch andere Teile des Eiweißelektropherogramms dazu befähigt sind, eine "Vorfraktion" zu bilden, wird unter der Wirkung höherer Konzentrationen Na-oleat deutlich, bei denen es durch das Anwachsen der Eiweiß-Vorfraktion auf Kosten aller anderen Fraktionen zu einer geradezu grotesken Umgestaltung des gesamten Elektropherogrammbildes kam (s. Abb. 10).

Sehr deutlich, soweit es die Änderungen der Wanderungsgeschwindigkeit betrifft, spiegelt sich der Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen auch im Verhalten der Albuminfraktion wider. Das ist einerseits wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß in erster Linie die Albumine Trägerproteine für die Gallensäuren sind (40), andererseits ist es verständlich, daß sich an ihrem Verhalten als dem der kleinsten Bestandteile des Eiweißspektrums Änderungen der Grenzflächenspannungen besonders gut ablesen lassen müssen.

Die α_1-Globulinfraktion zeigt eine besondere Beeinflußbarkeit durch Na-desoxycholicum, Na-oleat und Tween 80. Die Substanzen brachten in verschiedenen Konzentrationen diese Fraktion zum Verschwinden, wobei deren Proteine teilweise mit den näher zur Anode gelegenen Fraktionen der Albumine und der Vorfraktion wanderten (s. Abb. 2).

Die α_2-Globulinfraktion wurde bei einigen Versuchen unter dem Einfluß von Tween 80 bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese in zwei Teilfraktionen aufgespalten (s. Abb. 13 und 15 d - e). Dieser Vorgang war jedoch nicht immer reproduzierbar, so daß er nur am Rande erwähnt werden kann. Die α_2-Globulinfraktion war damit bei allen unseren Versuchen die am wenigsten von den oberflächenaktiven Substanzen beeinflußbare Fraktion.

Eine regelmäßige Aufspaltung war dagegen bei der ß-Globulinfraktion unter dem Einfluß von Zephirol und Tween 80 zu beobachten (s. Abb. 13, 17, 18 d - f). Unter der Wirkung von Zephirol war sie schon bei Anwendung der einfachen Elektrophorese sichtbar, doch wurde sie erst besonders deutlich - dann auch bei Anwendung von Tween 80 - bei Benutzung der abgewandelten Elektrophorese. Auf den Zusammenhang der Änderungen dieser Fraktion mit dem Verhalten der ß-Lipoproteide wird später noch eingegangen.

Regelmäßige, reproduzierbare Beeinflussungen der Wanderungsgeschwindigkeit der γ-Globuline durch die oberflächenaktiven Substanzen können nicht angegeben werden. Quantitative Veränderungen wurden nicht festgestellt. Sie auszuschließen war jedoch nur dann möglich, wenn die γ-Globuline nicht von anderen Fraktionen überlagert wurden, wie es häufig besonders unter dem Einfluß der kationischen oberflächenaktiven Substanzen der Fall war.

3. Wechselseitige Beeinflussung der Lipoproteid- und Proteinfraktionen

Bei der bisher verfolgten Betrachtungsweise entsteht leicht der Eindruck, daß es sich bei diesen Abweichungen vom normalen Elektropherogramm der Lipoproteide und Proteine um ein beziehungsloses Nebeneinander verschiedenster Einzelergebnisse entweder im Lipoproteid- oder im Eiweißspektrum handele, die aber in keinem Zusammenhang miteinander stünden.

Tatsächlich gibt es Hinweise dafür, daß die Wirkung der untersuchten oberflächenaktiven Substanzen auf Lipoproteide und Eiweiße, soweit sie ihren Ausdruck im Elektropherogramm findet und dort auch erfaßt werden kann, häufig voneinander unabhängig bzw. sogar entgegengesetzt ist.

So ist unter dem Einfluß von Tween 80 das Verhalten der Wanderungsgeschwindigkeit von Eiweiß- und Lipoproteidfraktionen völlig verschieden. Die Lipoproteide werden bei Konzentrationen über 10 mg % Tween 80 im Serum verlangsamt, die Proteinfraktionen dagegen beschleunigt. Der gleiche Vorgang wurde bei Benutzung der normalen Elektrophorese auch unter Anwendung von Zephirol beobachtet. Aus derartigen Versuchen grundsätzlich auf ein unabhängiges Verhalten der Lipoproteid- und Proteinfraktionen zu schließen, wäre jedoch nicht angebracht.

Denn auf Grund unserer Beobachtungen bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese stellten wir wiederholt fest, daß die Bedingungen der normalen Elektrophorese, unter denen die oben erwähnten Veränderungen beobachtet wurden, kein genügend scharfes Elektropherogrammbild vermitteln, um Veränderungen unter dem Einfluß oberflächenaktiver Substanzen besonders im Elektrodiagramm der Eiweiße genügend deutlich zum Ausdruck bringen zu können, aus denen in der Frage des übereinstimmenden Verhaltens der Änderungen des Lipoproteid- und Eiweißelektropherogramms ein eindeutiger Schluß zu ziehen möglich wäre. Insbesondere erscheinen in ihrer Lokalisation verschobene Fraktionen bzw. von den normalen Proteinfraktionen abgespaltene Fraktionsteile im routinemäßig gewonnenen Elektrodiagramm nicht genügend scharf von der Umgebung abgesetzt, so daß ihre Erkennung häufig nicht möglich ist oder wenigstens große Schwierigkeiten macht (s. a. Beschreibung der Methode). Daß es in der Tat einen eindeutigen Zusammenhang zwischen den Veränderungen des Lipoproteid- und Proteinspektrums gibt, beweisen daher in erster Linie unsere Versuche mit der abgewandelten Elektrophorese.

Gerade unsere Versuche mit Tween und Zephirol (s. Abb. 15 und 18) zeigen, daß die ß-Lipoproteide immer durch eine ihnen im Elektrophe-

rogramm der Eiweiße gleichgelagerte Proteinfraktion begleitet sind, von der wir annehmen, daß sie nichts anderes als ihr Proteidanteil ist, der zwar bei der normalen Lokalisation der ß-Lipoproteide im Bereich der ß-Globulinfraktion von dieser überlagert wird, aber dann gut zum Ausdruck kommt, wenn unter dem Einfluß der oberflächenaktiven Substanzen die ß-Lipoproteide ihre normale Lokalisation im Bereich der ß-Globuline verlassen und damit auch ihr Proteidanteil in seiner Lagerung im Eiweißelektropherogramm so verschoben wird, daß er als freie Fraktion zur Darstellung kommen kann (s. Abb. 15 d - g, und Abb. 18 d - h). Seine hier beobachtete Stärke von 3,2 bzw. 6,7 Rel. % sagt zwar nichts über die absolute Stärke der Proteinbegleitfraktion aus - sie ist dazu auch nicht genügend von den umgebenden Fraktionen abgrenzbar - zeigt aber doch ihren nicht unerheblichen Anteil an der ß-Globulin-Gesamtfraktion.

Durch die Änderungen im Lipoproteidspektrum unter dem Einfluß der verwandten Substanzen werden damit Veränderungen im Eiweißelektropherogramm, wie das Auftreten neuer abgespaltener Fraktionen u. a. erst erklärt und verlieren durch ihre Beziehungen zu Lipoproteidfraktionen ihren zufälligen Charakter.

Das trifft nicht nur für die Veränderungen der ß-Globulinfraktion unter dem Einfluß von Tween und Zephirol zu. Es wurde auch unter der Wirkung von Na-desoxycholicum durch den Einfluß angedeutet, den das höhere Wanderungsvermögen der ß-Lipoproteide und damit auch ihres Proteidanteils durch die veränderte Stärke der jeweils von diesen überlagerten Eiweißfraktionen auf das Elektropherogramm der Eiweiße nahm (s. Tab. 5).

Daß sich für diese Untersuchungen besonders günstig die Fraktion der ß-Lipoproteide erweist, liegt allein an der größeren Stärke der Fraktion gegenüber den α-Lipoproteiden. Durch dieses quantitative Überwiegen der ß-Lipoproteidfraktion wird offensichtlich der Nachteil des an sich geringeren Eiweißgehaltes der ß-Lipoproteide gegenüber dem der α-Lipoproteide ausgeglichen.

Einen entsprechenden Nachweis des Proteidanteils der α-Lipoproteide zu erbringen, war aus den genannten Gründen sehr viel schwieriger.

Als angedeutete "Eiweißvorfraktion" trat er jedoch bei der durch das Vorwandern der α-Lipoproteide erfolgten Bildung der Lipoproteid-Vorfraktion unter dem Einfluß der anionischen oberflächenaktiven Substanzen deutlich in Erscheinung, noch bevor sich die eigentliche auch quantitativ erfaßbare Vorfraktion im Elektropherogramm der Eiweiße bildete (Abb. 11, c, d, e).

Obwohl die Proteingruppe nur von sehr geringer Stärke ist, war ihr Auftreten so regelmäßig mit der Bildung der Lipoproteid-Vorfraktion verbunden und entsprach in ihrer Lokalisation so genau der vor den Albuminen als "Vorfraktion" anfärbbaren α-Lipoproteidfraktion, daß an der Zusammengehörigkeit beider Fraktionen kein Zweifel sein kann.

Zu ihrer Darstellung war aber immer der Auftrag einer größeren Serummenge zur Elektrophorese notwendig, als gemeinhin zur Proteinelektrophorese verwandt wird. Wir benutzten im allgemeinen 0,03 ml.

Diese Proteingruppe, der Proteidanteil der α -Lipoproteide, darf jedoch mit der erst bei höheren Konzentrationen auftretenden Eiweiß-Vorfraktion nur insofern in Zusammenhang gebracht werden, als sie später von ihr überlagert und zu einem Teil dieser Fraktion wird. Auch entspricht diese bei höheren Konzentrationen von Na-desoxycholicum und Na-oleat sich bildende Eiweiß-Vorfraktion in ihrer Lokalisation in keiner Weise so genau der Lipoproteidvorfraktion, wie das für die oben beschriebene Proteingruppe bezeichnend ist (s. Abb. 6 c, 6 d, 11 f). In einigen Versuchen war es auch möglich, unter dem Einfluß von Tween 80 und Zephirol den Proteidanteil der α -Lipoproteide in genauer lokaler Zuordnung zu den letzteren nicht nur als freie Fraktion im Bereich zwischen ß- und γ -Globulinfraktion zur Darstellung zu bringen (s. Abb. 15 g; 18 f; 18 h;), sondern auch diesen Proteidanteil durch die Zunahme der Fraktionsstärke der auf Grund der abgeänderten Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteide jeweils von ihnen überlagerten Proteidfraktionen wahrscheinlich zu machen (s. Tab. 13 und 15).

Wir können auf Grund all dieser Betrachtungen die Ansicht von MORA, REBEYROTTE und POLONOWSKI (29) nicht teilen, die anhand ihrer elektrophoretischen Untersuchungen unter dem Einfluß von oberflächenaktiven Substanzen bei Änderungen im Verhalten der Lipoproteidfraktion keine entsprechenden Änderungen im Proteinelektropherogramm fanden und aus diesem Grunde annahmen, daß das Verhalten der Lipoproteide auf das Elektropherogramm der Eiweiße keinen Einfluß habe. Sie mußten zu dieser Ansicht aber dadurch kommen, daß von ihnen nur Untersuchungen mit dem normalen Elektrophoreseverfahren angestellt wurden, in diesem Verfahren aber - wie oben erwähnt - die den Lipoproteiden zugeordneten Veränderungen im Proteinelektropherogramm nicht genügend scharf zur Ausbildung kommen.

V. Diskussion über den Wirkungsmechanismus der untersuchten Substanzen

a) Die Oberflächenaktivität

Um die Wirkung der Netzmittel bei den Untersuchungen zu analysieren, muß berücksichtigt werden, daß die Proteine und Lipoproteide zu den kolloidalen Substanzen gehören und sich im Serum als disperse Phase in einem wässrigen Dispersionsmittel gelöst befinden. Beide Bestandteile sind dabei durch Grenzflächen voneinander getrennt.

Auf diese Grenzflächen ist die Wirkung der oberflächenaktiven Substanzen gerichtet. Es sei vorläufig davon abgesehen, daß während des Elektrophoreseverfahrens auch andere durch das Verfahren selbst bedingte wichtige Grenzflächen in Erscheinung treten (Serum-Filterpapier u. a.).

Die an den Grenzflächen der kolloidalen Strukturen der Albumine, Globuline und Lipoproteide sich abspielenden Adsorptionsprozesse sind in ihrem Ausmaß abhängig von der Grenzflächenspannung Protein- bzw. Lipoprotied-Restserum. Auffällig bei der Auswertung unserer Versuchsergebnisse ist eine bevorzugte Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Lipoproteide gegenüber den Proteinen. So kann immer wieder eine wesentlich höhere Beeinflussung der Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteide gegenüber den Proteinfraktionen beobachtet werden. Diese bevorzugte Wirkung auf die Lipoproteide macht sich außerdem darin bemerkbar, daß für das Auftreten der Lipoproteid-Vorfraktion jeweils geringere Netzmittelkonzentrationen notwendig sind als für das der Protein-Vorfraktion. Besonders deutlich wird sie auch in den auffälligen Veränderungen der Wanderungsgeschwindigkeit und der Stellung der Lipoproteidfraktionen unter der Wirkung von Tween 80, während die Proteinfraktionen - soweit sie nicht Bestandteile der Lipoproteide enthalten - ein kaum verändertes Bild zeigen.

Es wäre die Frage zu diskutieren, ob diese bevorzugte Wirkung der oberflächenaktiven Substanzen auf die Lipoproteide nicht durch unterschiedliche Grenzflächenspannungen der Lipoproteid- und Eiweißkolloide und damit durch unterschiedliche Energien für die Adsorption der oberflächenaktiven Substanzen hervorgerufen sein könnte.

Obwohl im allgemeinen an biologischen Grenzflächen geringe Spannungen von meist weniger als 1 dyn/cm vorliegen - dies gilt insbesondere für die Grenzfläche Protein-wässrige Phase und zeigt sich in der starken Hydratation der Eiweißkörper - können für die Grenzflächen zwischen den Lipoproteiden und dem Restserum auf Grund des Aufbaus der Lipoproteide aus hauptsächlich hydrophoben, die Grenzflächenspannung erhöhenden Bestandteilen für diese höhere Spannungen vermutet werden. Natürlich werden hier nicht die gegenüber den Grenzflächen Protein-wässrige Phase weitaus höheren Spannungswerte reiner ölig-wässriger Grenzflächen auftreten - die in einem von NETTER (71) angegebenen Beispiel durch Zusatz geeigneter Netzmittel von 50 dyn/cm auf unter 1 dyn/cm gesenkt werden konnten - da es sich in unserem Falle nicht um derart freie Grenzflächen handelt. Insbeson-

dere gilt dies für die Lipoproteide, deren Oberfläche wahrscheinlich zu einem großen Teil von Proteinen besetzt ist. Dennoch möchten wir die Möglichkeit nicht unerwähnt lassen, die bevorzugte Wirkung der Netzmittel auf die Lipoproteide auf einen größeren Adsorptionsumfang dieser Substanzen an die Lipoproteide auf Grund höherer Grenzflächenspannungen als sie die Eiweißkolloide aufweisen, zurückzuführen.

Die bevorzugte Wirkung der oberflächenaktiven Substanzen auf die Lipoproteide hat einen weiteren Grund wahrscheinlich darin, daß wir bei ihnen besonders mit dem Auftreten der "gerichteten Adsorption" rechnen müssen. Dabei kommt es zu einer bestimmten Lagerung des adsorbierten Moleküls an die adsorbierende Grenzfläche, für die die Struktur dieses Moleküls von ausschlaggebender Bedeutung ist. Entsprechend der Lösungsmittelaffinität der den Molekularkomplex aufbauenden Gruppen richten sich die Moleküle in der Grenzschicht aus. Bekannt ist das Beispiel der wasserunlöslichen höheren Fettsäuren, denen in den vorliegenden Versuchen besonders Na-oleat und die Gallensäuren entsprechen. Infolge der Wasseraffinität der Carboxylgruppe wendet sich diese der wässrigen Phase zu, während sich der Kohlenwasserstoffrest zur anderen Seite in unserem Fall zur lipoiden Schicht orientiert. Es führt dieser Vorgang zu einer exakten Ausrichtung der Moleküle auf engstem Raum und damit zu einer dichten Besetzung der adsorbierenden Oberfläche mit adsorbierten Molekülen, was im Hinblick auf den Aufbau der von uns verwandten Substanzen aus zugleich hydrophilen (Carboxyl-, $-NH_3^+$ (alkylsubstituierte Ammoniumbasen)-Gruppen) und lipophilen Gruppen (Kohlenwasserstoffreste) erneut ihre Wirkung auf die Lipoproteide begründete.

In welchem Umfang bei unseren Versuchen Adsorptionen auf elektrostatischer Basis berücksichtigt werden müssen, sei dahingestellt. Die Absättigung der "Restvalenzen" des Protein- und Lipoproteidkörpers, die für den Elektrophoresevorgang von außerordentlicher Wichtigkeit sind (Bildung der elektrischen Doppelschicht!), wird durch serumeigene Bestandteile wahrscheinlich in einem solchen Umfang erfolgen, daß elektrostatische Erscheinungen für den Adsorptionsprozeß der zugefügten Netzmittel von geringerer Bedeutung sein werden. Es ist wenigstens auffällig, daß sowohl neutrale, kationische als auch anionische Substanzen auf dieselben Proteine bzw. Lipoproteide wirken.

Wie schon oben erwähnt, treten bei unseren Untersuchungen, bedingt durch das Elektrophoreseverfahren, auch andere als die eben besprochenen Grenzflächen in Erscheinung und unterliegen ebenfalls, insbesondere bei der abgewandelten Elektrophorese der Einwirkung der zugefügten oberflächenaktiven Substanzen. Es sind dies vor allem die Grenzflächen, die das Filterpapier gegenüber der wässrigen Pufferlösung und dem Serum besonders den einzelnen Protein- und Lipoproteidkörpern bietet. An ihnen werden sich nicht nur die beim abgewandelten Elektrophoreseverfahren der Pufferlösung, sondern auch die über das Adsorptionsvermögen der kolloidalen Bestandteile dem Serum zugeführten oberflächenaktiven Substanzen anreichern. Welche Wirkung sie hier im einzelnen entfalten, sei dahingestellt. Allgemein wird es zu einer Herabsetzung der Grenzflächenspannungen kommen. Da das Wasser - und bei der Pufferlösung handelt es sich um eine wässrige Phase -

seines Dipolcharakters wegen eine besonders hohe Oberflächenspannung besitzt, ist eine Bedeutung dieses Vorganges für die elektrophoretische Wanderung der Lipoproteid- und Proteinteilchen gut einzusehen, zumal gerade das Filterpapier Grenzflächen in großem Umfang aufweist.

b) Der polare Charakter der Gallensäuren und anderen Netzmittel

Bei einem Überblick über die Versuchsergebnisse lassen sich die untersuchten Substanzen nach ihrer Wirkung auf die Wanderungsfähigkeit der Lipoproteide in zwei Gruppen einteilen: Die eine Gruppe beschleunigt die elektrophoretische Wanderung der Lipoproteide (Gallensäuren und Na-oleat), die andere Gruppe hemmt sie (Tween und Zephirol). Dieses Verhalten hängt offensichtlich mit der elektrischen Ladung der jeweils untersuchten Substanz bzw. ihres die Oberflächenaktivität tragenden Molekülanteile zusammen.

So zeigen die anionischen Gallensäuren als Träger gleichartiger elektrischer Ladung den Lipoproteiden gegenüber grundsätzlich einen einheitlichen Wirkungstyp, der sich bezeichnenderweise am ehesten mit der Wirkung des ebenfalls anionischen Na-oleats deckt und sich am besten in der durch Na-cholalicum, Na-desoxycholicum und Glykocholsäure herbeigeführten Beschleunigung der α-Lipoproteide in Richtung zur Anode und dem dadurch bedingten Auftreten dieser Fraktion vor den Albuminen als Vorfraktion dokumentiert. Diese Versuchsergebnisse stimmen auch überein mit Ergebnissen von SCHÖLL-SCHETTLER (47), die bei ähnlichen Versuchen nach Heparininjektionen eine Erhöhung der α-Lipoproteidfraktion und ebenfalls das Auftreten einer Lipoproteid-Vorfraktion beobachteten. Ein wichtiger Unterschied besteht aber darin, daß bei den Versuchen dieser beiden Autoren das zugeführte Heparin mit dem Serum "in vivo" in Berührung kam, während wir die oberflächenaktiven Substanzen "in vitro" dem Blutserum zuführten und so ihren Einfluß nur auf ihre Wirkung im Blutserum zurückführen können, während sich jede aktive Beteiligung irgendwelcher Körpergewebe von vornherein ausschließt.

Auch die ausgeprägte Wirkung von Na-desoxycholicum auf das Elektropherogramm der Eiweiße trägt deutlich den Stempel ihrer Abhängigkeit von dem polaren Charakter dieser Gallensäure. Er macht sich besonders bemerkbar durch die anodisch gelagerte neu auftretende Eiweißvorfraktion.

Die Bedeutung der Ladung der zugesetzten Körper für die Veränderungen im Elektropherogramm der Eiweiße und Lipoproteide wird noch unterstrichen durch die Ergebnisse der Untersuchungen mit Na-oleat, Tween 80 und Zephirol. Schon GORDON (17) beobachtete bei Versuchen mit Na-oleat eine Wanderungsbeschleunigung der beiden Lipoproteidfraktionen und erklärte dies mit einem Zuwachs an negativer Ladung durch die Fettsäureanionen, die sich an die Lipoproteide binden würden.

Bei unseren Versuchen ist auffällig, daß Na-oleat beinahe dieselben elektrophoretischen Veränderungen hervorruft, wie Na-desoxycholsäure, ein Vorgang, der nur dadurch erklärlich ist, daß sich beide

Substanzen in einem Punkt berühren: Der gleichartigen elektrischen Ladung. Die Veränderungen betreffen sowohl das Spektrum der Eiweiße als auch der Lipoproteide. Dies gilt insbesondere für das Auftreten der Vorfraktion im Lipoproteid- und Eiweißspektrum. Ein Unterschied besteht nur - wie oben schon erwähnt - in der verschiedenen Wirkungsintensität der Gallensäuren und des Na-oleat.

Betrachtet man die elektrophoretischen Veränderungen unter dem Einfluß von Zephirol in Beziehung zu dessen kationischen Charakter, so zeigt sich ein der positiven Ladung des Zephirols ganz entsprechendes Verhalten der Lipoproteidfraktionen. Nach anfänglich geringem Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeit fällt diese sehr stark bis auf 36 % ihres Ausgangswertes (bei 500 mg %) ab. (Als Beispiel ist das Verhalten der α-Lipoproteidfraktion angeführt.) In diesem Falle wird also auf Grund einer kationischen Ladung des Netzmittels eine Beschleunigung zur Katode bzw. eine Verminderung der anodischen Wanderungsgeschwindigkeit erreicht. Diese Wirkung des Zephirols ist ganz analog der des Na-oleats bzw. der Gallensäuren, bei denen durch eine anionische Ladung die Erhöhung der anodischen Wanderungsgeschwindigkeit erreicht wird.

Daß jedoch die Netzmittelwirkung bei der Elektrophorese nicht nur parallel dem Ionencharakter der jeweils verwandten Substanz verläuft, darauf weisen die Versuche mit einer neutralen Substanz wie Tween 80 hin. Auch unter seiner Wirkung kam es zur Wanderungsverlangsamung der Lipoproteidfraktionen. Wir möchten annehmen, daß die an die Lipoproteide gebundenen Tween 80 Moleküle in irgendeiner Form eine Änderung im Aufbau der Lipoproteidkörper bewirken, die deren Wanderungsverlangsamung hervorruft. Dabei wäre insbesondere an ein Vergrößerung des einzelnen Lipoproteidkörpers durch die anhaftenden Tween 80 Moleküle zu denken.

Es fällt weiterhin auf, daß sowohl unter der Einwirkung von Zephirol als auch von Tween 80 eine Beschleunigung der Eiweißfraktionen zu beobachten ist. Tween 80 als neutraler Körper kann diese Beschleunigung nicht durch irgendwelche Ladungsänderungen der Fraktionsbestanteile hervorrufen. Es liegt nahe anzunehmen, daß diese Beschleunigung durch eine allgemein oberflächenaktive Wirkung hervorgerufen werden könnte, wobei in erster Linie an Änderungen der Grenzflächenspannungen während des Elektrophoresevorganges nicht nur im Serum, sondern auch an den Grenzflächen Filterpapier-umgebende wässrige Phase bzw. Filterpapier - Proteinkörper gedacht werden muß, wie sie schon oben erwähnt wurden. Auch die Beschleunigung der Eiweißfraktionen durch Zephirol muß durch einen derartigen Vorgang begründet sein.

Eine ladungsunabhängige Wirkung ist auch bei den Untersuchungen mit den Gallensäuren erkenntlich. Durch RUDMAN und KENDALL wissen wir, daß nur bestimmte Eiweißfraktionen befähigt sind, Cholsäure, Nadesoxycholsäure sowie Glykocholsäure zu binden (40). Die γ-Globuline sind nach ihren Untersuchungen in keinem Fall Trägermolekül für eine Gallensäure, für die Cholsäure und Glykocholsäure wäre es nur die Albuminfraktion; Na-dehydrocholicum schließlich wird von keiner Frak-

tion gebunden. Bei den Untersuchungen mit diesen Substanzen findet man jedoch eine mit zunehmender Konzentration der zugesetzten Substanz ansteigende Beschleunigung mehr oder weniger aller Eiweißfraktionen. Auch dies Verhalten müssen wir als Zeichen für eine die Wanderungsbedingungen verbessernde allgemeine Wirkung der Oberflächenaktivität der zugefügten Gallensäuren auffassen. Entsprechend den Beobachtungen bei den Lipoproteiden ist hier die Feststellung bemerkenswert, daß die Fraktion, die nach RUDMAN und KENDALL die größte Bindungsfähigkeit gegenüber Desoxycholsäure aufweist; die Albumine, bei den Untersuchungen mit dieser Substanz auch die von allen Proteinfraktionen deutlichste ladungsabhängige Netzmittelwirkung aufweist. Dies gilt wenigstens für die Versuche mit der abgewandelten Elektrophorese, während bei Untersuchungen mit dem normalen Elektrophoreseverfahren die Konzentration der Gallensäure offenbar zu gering ist, um wesentliche oberflächenaktive Wirkungen hervortreten lassen zu können.

c) Die spezielle Wirkung einzelner Substanzen

Bisher wurden als Faktoren im Wirkungsmechanismus der verwandten Gallensäuren und anderen Netzmittel ihre Oberflächenaktivität und ihr polarer Charakter herausgestellt. Durch sie allein werden jedoch nicht alle Änderungen im Verhalten der Protein- und Lipoproteidfraktionen erklärt. Es tritt im Rahmen der Oberflächenaktivität und in Abhängigkeit vom polaren Charakter bei vielen Substanzen als weiterer Faktor eine dieser Substanz eigentümliche, besonders ausgeprägte Wirkung auf die eine oder andere Fraktion hinzu.

So fiel Na-desoxycholicum gegenüber den anderen ebenfalls anionischen Gallensäuren dadurch auf, daß es nur unter seiner Wirkung zum Auftreten einer Eiweißvorfraktion kam. Die Cholsäure mit ihrer wesentlich höher anodisch beschleunigenden Fähigkeit, sowie alle anderen Gallensäuren, zeigten diese Wirkung nicht. Eine weitere, nur unter Wirkung von Na-desoxycholicum zu machende Beobachtung ist das Verschwinden der α_1-Globulinfraktion bei höheren Konzentrationen dieser Gallensäure.

Das auffälligste Beispiel für die spezielle Wirkung eines Netzmittels im Rahmen unserer Untersuchungen ist jedoch die besondere Wirkung von Tween 80 auf die α-Lipoproteidfraktion. Die durch Tween 80 bewirkte Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit der α-Lipoproteide führte schließlich bis zu dem schon früher beschriebenen Stellungstausch beider Lipoproteidfraktionen. Dieser Vorgang läuft zwar im Rahmen der bisher besprochenen Wirkungsmechanismen ab, zeigt aber eine so betonte Wirkungsrichtung des Tween 80 auf die α-Lipoproteide, daß man hier von einer speziellen Wirkung des Tween 80 auf diese Fraktion sprechen kann. Eine weitere, nur unter Einwirkung von Tween 80 häufig zu machende Beobachtung ist die Aufspaltung der α_2-Globulinfraktion im Elektropherogramm bei Anwendung der abgewandelten Elektrophorese und bei Konzentrationen von 50 - 100 mg % dieser Substanz im Serum.

Unter der Wirkung von Zephirol schließlich kam es zu einer typischen

Aufspaltung der ß-Globuline schon bei Anwendung der einfachen Elektrophorese, die aber besonders deutlich unter der abgewandelten Elektrophorese wurde, wobei schließlich festgestellt werden konnte, daß es sich bei der abgespaltenen Fraktion sehr wahrscheinlich um die Proteidkomponente der ß-Lipoproteide handelt. Daher möchten wir annehmen, daß sich die Wirkungsrichtung des Zephirols nicht so sehr auf diesen abgespaltenen Teil der ß-Globulinfraktion als vielmehr auf die ß-Lipoproteidfraktion richtet, analog dem besonderen Einfluß des Tween 80 auf die α-Lipoproteide.

VI. Zusammenfassung

Den Seren mehrerer gesunder Versuchspersonen wurden "in vitro" verschiedene Gallensäuren (Na-desoxycholicum, Na-dehydrocholicum, Na-cholalicum, Glykocholsäure) und andere oberflächenaktive Substanzen (Na-oleat, Tween 80 und Zephirol) zugefügt. Die Seren wurden anschließend mit Hilfe sowohl der normalen als auch von uns abgewandelter Verfahren für die Protein- und Lipoproteidelektrophorese untersucht.

Dabei konnte ein Einfluß der Gallensäuren und anderer oberflächenaktiven Substanzen auf die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteide und - in geringerer Ausprägung - der Proteine nachgewiesen werden. Es kam in Abhängigkeit der jeweils verwandten Substanz sowohl zur Wanderungsbeschleunigung als auch zur Wanderungsverlangsamung der Protein- und Lipoproteidfraktionen.

Durch die erhöhte Wanderungsgeschwindigkeit der Lipoproteid- und Proteinfraktionen, insbesondere unter dem Einfluß anionischer Netzmittel, wird die Bildung einer vor der Albuminfraktion nachzuweisenden Lipoproteid- und Eiweiß-Vorfraktion hervorgerufen, deren Auftreten zum größten Teil unabhängig voneinander erfolgt.

Im Zuge der Untersuchungen konnten nach Veränderung der Lage der Lipoproteidfraktionen im Elektropherogramm unter der Wirkung der Netzmittel neu auftretende Proteinfraktionen im Eiweißelektropherogramm zur Ansicht gebracht werden. Bei entsprechender Anfärbung ließ sich nachweisen, daß diese Proteinfraktionen in ihrer Lage im Elektropherogramm genau den in ihrer Wanderungsstrecke geänderten Lipoproteidfraktionen entsprachen. Es wird angenommen, daß es sich bei den beschriebenen neu auftretenden Proteinfraktionen um den Proteidanteil der Lipoproteide handelt.

Auf Grund der durch die verschiedenen Netzmittel bedingten Änderungen im Lipoproteid- und Proteinspektrum ist zu schließen, daß die elektrophoretische Wirkung dieser Substanzen abhängig ist:

1. von ihrer Oberflächenaktivität
   und
2. vom polaren Charakter der angewandten Substanz bzw. des die oberflächenaktive Wirkung tragenden Molekülanteils.

Außerdem wurde eine spezielle Wirkung verschiedener oberflächenaktiver Substanzen auf die α- bzw. ß-Lipoproteide und einige Proteinfraktionen beobachtet und im einzelnen beschrieben.

VII. Literaturverzeichnis

1. AHRENS, jr., E. H. and H. K. KUNKEL:
The stabilization of serum lipid emulsions by serum phospholipids.
J. exper. Med. 90 409 (1949)

2. BEHER, W. T. and W. L. ANTHONY:
Liver cholesterol mobilization in mice as effected by dietary ß-Sitosterol and cholic acid.
Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. 99 2 (1958)

3. BERG, G. und H. SCHÖN:
Das Verhalten der Proteine und proteingebundenen Kohlenhydrate im Serum nach Verabreichung eines Netzmittels.
Blut 5 297 (1959)

4. BERGSTRÖM, S. und H. GLOOR:
Metabolism of bile acids in rat liver slices and homogenates. Bile acids and steroids 15.
Acta chem. Scandinav. 8 1373 (1954)

5. BLOCH, K., B. N. BERG, D. RITTENBERG:
The biological conversation of cholesterol to cholic acid.
J. biol. chem. 149 511 (1943)

6. BYERS, S. O. and M. FRIEDMAN:
Effect of various bile acids ou the hypercholesteremia following biliary obstruction in the rat.
Amer. J. Physiol. 168 138 (1952)

7. BYERS, S. O., M. FRIEDMAN, M. W. BIGGS and B. GUMING:
Observations concerning the production and exeretion of cholesterol in mammals. IX. The mechanism of the hypercholesteremie effect of cholic acids.
J. exper. Med. 97 511 (1953)

8. COHN, E. J.:
The chemical specificity of the interaction of diverse human plasma proteins.
Blood 3 471 (1948)

9. COREY, E.:
The serum dihydroxy-trihydroxy bile acid ratio in liver and biliary tract disease.
J. clin. Investig. 35 695 (1956)

10. DAWNS, J. J., E. GELLER, K. LUNAU and L. T. MAUN:
Use of a monionie detergent in paper electrophoresis oft serum proteins.
J. Lab. a. clin. Med. 51 2 (1958)

11. DURRUM, E. L., M. H. PAUL and E. R. B. SMITH:
Lipid detection in paper electrophoresis.
Science 116 428 (1952)

12. FRIEDMAN, M. and S. O. BYERS:
Cholic acid: au adequate stimulus for hypercholesteremia in normal fasting rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. 78 528 (1951)

13. FRIEDMAN, M., S. O BYERS and F. MICHAELIS:
Production and excretion of cholesterol in mammals.
IV. Role of liver in restoration of plasma cholesterol after experimentaly induced hypercholesteremia.
Amer. J. Physiol. 164 789 (1951)

14. FRIEDMAN, M. and S. O. BYERS:
Production and excretion of cholesterol in mammals.
VI. Bile acid accumulation in production of hypercholesteremia occaring after biliary obstruktion.
Amer. J. Physiol. 168 292 (1952)

15. FRIEDMAN, M., S. O. BYERS and R. H. ROSENMANN:
The accumulation of serum cholate and its relationship to hypercholesterinemia.
Science 115 313 (1952)

16. FRIEDMAN, M. and S. O. BYERS:
Role of hyperphospholipidemia and neutral fat increase in plasma in the pathogenesis of hypercholesteremia.
Amer. J. Physiol. 186 13 (1956)

17. GORDON, R. S.:
Interaction between oleate and the Lipoproteins oft human serum.
J. clin. Invest. 34 477 (1955)

18. IRVIN, J. L., A. G. JOHNSTON and J. KOPALA:
A photometric method for the determination of cholates in bile and blood.
J. Biol. Chem. 153 439 (1944)

19. JARISCH, A.:
Über das Verhalten von Seifenlösungen bei verschiedener H-Ionenkonzentration.
Biochem. Z. 134 163 (1923)

20. JENKE, M.:
Bestimmung der Gallensäuren im Blut.
Klin. Wschr. 18 317 (1939)

21. JOPPICH, G.:
Über das Verhalten der Gallensäuren im Blut von ikterischen und nicht ikterischen Kindern.
Mschr. Kinderhk. 101 51 (1953)

22. JOSEPHSON, B.:
The determination of cholic acids in blood.
Biochem. J. 29 1519 (1935)

23. KELLNER, A., J. W. CORREL and A. T. LADD:
Sustained elevation of blood cholesterol and phospholipid levels in rabbits given detergents intravenously.
Federat. Oroc. 8 359 (1949)

24. KELLNER, A., J. W. CORREL and A. T. LADD:
Sustained hyperlipemic induced in rabbits by means of intravenously injected surface-active agents.
J. exp. Med. 93 373 (1951)

25. KIER, L. C.:
A method for Simultaneous quantitative determination of cholic and desoxycholic acids.
J. Lab. a. Clin. Med. 40 755 (1952)

26. KORANSKY, W. und U. THIELE:
Kritische Untersuchungen einiger Methoden zur Bestimmung von Gallensäuren im Serum.
Klin. Wschr. 33 666 (1955)

27. KUNKEL, H. G. and A. G. BEARN:
Phospholipid studies of different serum Lipoproteins employing P 32.
Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. 86 887 (1954)

28. Lecomte du NOUY, P.:
Sur la capacite d'absorption de proteines du serum vis-a-vis de sels biliairis.
Compt. rend. Soc. de biol. 99 1097 (1928)

29. MORA, R., P. REBEYROTTE et J. POLONOWSKI:
Influence des substances tensioactives sour la mobilitè electrophorètique de Lipoproteides plasmatiques.
Bull. Ste. Chem. Biol. 37 9/10 (1955)

30. NYS, A. et J. VANDENBROUCKE:
L-èlectrophorèse des Lipoproteines dans les affecturès hepatiques.
Acta gastroenterolog. Belg. 19 142 (1956)

31. PEZOLD, F. D. u. A. KOFES:
Beitrag zur Photometrie gefärbter Filtrierpapierstreifen mittels des Transparenzverfahrens.
Klin. Wschr. 32 504 (1954)

32. PEZOLD, F. A.:
Isolierung des α -Lipoproteins aus Humanserum in der Ultrazentrifuge und sein Identitätsnachweis mittels Papierelektrophorese.
Naturwissenschaften 43 280 (1956)

33. PEZOLD, F. A.:
Zur Kenntnis der elektrophoretisch trennbaren Lipoproteidfraktionen im Blutserum.
Klin. Wschr. 35 475 (1957)

34. PEZOLD, F. A. O. F. de LALLA und J. W. GOFMAN:
Experimentelle Untersuchungen über die Zuordnung der papierelektrophoretisch bestimmten Lipoproteidgruppen zu den mittels präparativer Ultrazentrifugierung trennbaren Fraktionen.
Clinica Chim. Acta 2 43 (1957)

35. PEZOLD, F. A.:
Kritische Bemerkungen zur Anwendung der Papierelektrophorese in der ärztlichen Diagnostik.
Ärztl. Wschr. 13 129 (1958)

36. PEZOLD, F. A.:
Vergleichende Untersuchungen der Lipoproteine in Humanseren und Ultrazentrifugaten mittels der Zonenelektrophorese in Filtrierpapier und Agar-gel.
Clinica Chim. Acta 3 40 (1958)

37. ROSENMAN, R. H., S. O. BYERS and M. FRIEDMAN:
Role of cholate in dietary-indiced hypercholesteremia of rats and rabbits.
Amer. J. Physiol. 175 307 (1953)

38. ROSENMAN, R. H., M. FRIEDMAN and S. O. BYERS:
Observations concerning the cholate: cholesterol relation ship in clinical and experimental nephrosis.
J. clin. Invest. 32 121 (1953)

39. RUDMAN, D. and F. E. KENDALL:
Bile acid contact of human serum.
I Serum bile acids in patients with hepatic disease.
J. Ch. Invest. 36 530 (1957)

40. RUDMAN, D. and F. E. KENDALL:
Bile acid content of human serum.
II The binding of cholamie acids by human plasma proteins.
J. clin. Invest. 36 538 (1957)

41. SCHETTLER, G.:
Über die Wirkung der Gallensäuren auf Cholesterin- und Fettsäureresorption.
Z. inn. Med. 4 718 (1949)

42. SCHETTLER, G.:
Über Lipoproteide.
Vdlg. dtsch. Ges. inn. Med. 62 507 (1956)

43. SCHETTLER, G., M. EGGSTEIN und H. JOBST:
Zur papierelektrophoretischen Bestimmung der Lipoproteide.
Klin. Wschr. 34 684 (1956)

44. SCHETTLER, G., M. EGGSTEIN und H. JOBST:
Die essentielle Hyperlipämie.
Dtsch. med. Wschr. 83 1 (1958)

45. SCHETTLER, G. und M. EGGSTEIN:
Fette, Ernährung und Arteriosklerose.
Dtsch. med. Wschr. 83 702 (1958)

46. SCHNEIDERBAUR, A. und F. RETTENBACHER:
Über Eiweiß- und Lipoidelektrophorese des Serums beim Verschlußikterus.
Wien. mediz. Wschr. 106 852 (1956)

47. SCHÖLL, H. und G. SCHETTLER:
Heparinklärfaktor und Lipidstoffwechsel.
Dtsch. med. Wschr. 82 35 (1957)

48. SCHÖN, H. und G. BERG:
Das Verhalten der Serumlipide und Serumproteine nach Einverleibung eines Netzmittels.
Arzneimittelforschung 7 307 (1957)

49. SCHÖN, H. und N. HENNING:
Untersuchungen zur Regulation des Cholesterinstoffwechsels.
Dtsch. med. Wschr. 84 1385 (1959)

50. SCHOTZ, M. C., A. SEANN and J. H. PAGE:
Effect of triton on lipoprotein lipase of rat plasma.
Amer. J. Physiol. 188 399 (1957)

51. SCHRADE, W.:
Zur Regulation der Lipide des Blutes.
Dtsch. med. Wschr. 81 617 (1956)

52. SCHULZE, G.:
Quantitative Untersuchungen an den Lipiden des menschlichen Blutserums.
Arch. exper. Path. u. Pharm. 214 473 (1952)

53. SCHULZE, G. und H. L. KRÜSKEMPER:
Der Einfluß von körperfremden Fermentkomplexen auf den Fettstoffwechsel.
Vdlg. Dtsch. Ges. inn. Med. 62 497 (1956)

54. SCHULZE, G. und J. Y. STIERNSPITZ:
Untersuchungen über die Beziehungen von Gallensäuren und Lipiden in Serum und Leber.
Dtsch. Arch. klin. Med. 206 133 (1960)

55. SIPERSTEIN, M. D., J. L. CHAIKOFF and W. D. REINHARDT:
C^{14} cholesterol. V. Obligatory funktion of bile in intestinal absorption of chole sterol.
J. biol. Chem. 198 111 (1952)

56. SOBEL, A. E., M. GOLDBERG and S. R. SLATER:
Estimation of 7-Dehydrocholesterol, 7-Hydroxycholesterol and bile acids in serum.
Analyt. Chem. 25 629 (1953)

57. THANNHAUSER, S. J.:
Studies on the cholic acid concentration in the serum of humans and animals and studies on cholic acid output on a patient with bile fistula.
Trans. Assoc. Amer. Physicians. 57 290 (1942)

58. TRENCKMANN, H.:
Die Serumlipoproteide bei Erkrankungen der Leber.
Acta hepatolog. 5/I 68 (1957)

59. URIEL, J. et P. GRABER:
Emploé de colorants dans l'analyse èlectrophorètique et immuno èlectrophorètique en milieu gelifié.
Ann. de l'Institut Pasteur 90 427 (1956)

60. VEZAR, F. und A. KEETHY:
Die Bedeutung der gepaarten Gallensäuren für die Fettresorption.
Biochem. Z. 230 451 (1931)

61. WABERMANN, F., H. MÖRKI sen., Ch. WUNDERLY:
Zur Methodik und klinischen Beurteilung der elektrophoretisch bestimmten Lipoproteide im krankheitsveränderten Serum.
Wien. Zschr. inn. Med. 39 5 (1958)

62. WUNDERLY, Ch. und F. A. PEZOLD:
Über die Bindung von Fettfarbstoffen an die einzelnen Serumproteinfraktionen. Eine Anwendung der präparativen Papierelektrophorese.
Z. exp. Med. 120 613 (1953)

63. WUNDERLY, Ch. und S. PILLER:
Die Färbung der im Blutserum enthaltenen Proteine, Lipoide und Kohlenhydrate nach Papier-Elektrophorese.
Klin. Wschr. 32 425 (1954)

64. ZÖLLNER, N.:
Zur Struktur der Lipoproteine.
Dtsch. med. Wschr. 83 448 (1958)

Übersichtswerke

65. EMMRICH, R.:
Das Bluteiweißbild, Ferdinand Encke, Stuttgart 1957

66. FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ:
Physiologische Chemie, Bd. 2, T. 2, Bandteil a,
Springer Berlin - Göttingen - Heidelberg 1956

67. LETTRE-INHOFFEN-TSCHESCHE:
Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe.
Ferd. Encke Stuttgart 1954, I. Band

68. LEUTHARDT, Fr.:
Lehrbuch der Physiologischen Chemie.
Walter de Gruyter u. Co. Berlin 1957

69. MÜLLER-SEIFFERT-v. KRESS:
Taschenbuch d. Med. Klin. Diagnostik
Bergmann München 1959

70. NETTER, H.:
Biologische Physikochemie.
Athenaion Potsdam 1951

71. NETTER, H.:
Theoretische Biochemie.
Springer Berlin - Göttingen - Heidelberg 1959

72. RIVA, G.:
Das Serumeiweißbild.
Hans-Huber Bern-Stuttgart 1957

73. WOLF, K. L.:
Physik und Chemie der Grenzflächen
Springer 1957

74. WUNDERLY, Ch.:
Die Papierelektrophorese.
Sauerländer u. Co.
Arau und Frankfurt a. Main 1959

Herrn Professor Dr. med. F. A. Pezold gilt mein besonderer Dank sowohl für die Überlassung des Themas der Arbeit wie auch für wertvolle Hinweise bei ihrer Durchführung.

Lebenslauf

Am 5. Februar 1933 wurde ich als Sohn des Lehrers Otto Fröhlich und seiner Ehefrau Helene geb. Bonin in Buschdorf Krs. Flatow geboren.

Von 1939 bis 1945 besuchte ich in Schneidemühl die Grundschule und später das Freiherr-vom-Stein-Gymnasium. Mein Vater fiel 1939 im Polenfeldzug.

Nach unserer Vertreibung aus Schneidemühl 1945 wohnten wir zuerst in Potsdam später in Berlin. Hier legte ich 1953 am Canisius-Kolleg, einem humanistischen Gymnasium, meine Reifeprüfung ab.

Anschließend studierte ich in Berlin und Freiburg i. Br. Medizin. Die ärztliche Prüfung bestand ich im September 1959 an der medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin mit dem Urteil "sehr gut".

Zur Zeit bin ich als Medizinalassistent in der Universitäts-Frauenklinik in Heidelberg tätig.

Christian Fröhlich